

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und  
Schmerztherapie der Medizinischen Fakultät der Universität des  
Saarlandes, Homburg / Saar  
(Direktor: Prof. Dr. Thomas Volk)

**Einfluss von Melatonin auf Signalwege in Splenozyten  
von Wildtyp- und (MT<sub>1</sub><sup>-/-</sup>/MT<sub>2</sub><sup>-/-</sup>)-Mäusen nach  
polymikrobieller Sepsis**

***Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin***

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2014**

vorgelegt von: Sarah Altmeyer

geb. am: 27. Dezember 1982 in Illingen / Saar



# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>II. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>7</b>
<b>III. Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Zusammenfassung / Abstract .....</b>	<b>13</b>
1.1 Zusammenfassung .....	13
1.2 Abstract .....	15
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>16</b>
2.1 Sepsis .....	16
2.1.1 Grundlagen der Sepsis.....	16
2.1.2 Pathophysiologie der Sepsis .....	18
2.1.3 Peritonitis als Sepsisursache.....	20
2.2 Die Milz und das Immunsystem .....	21
2.3 Reizweiterleitung über Signalkaskaden im Immunsystem.....	23
2.3.1 PI3K/Akt.....	24
2.3.2 MAP-Kinase Wege.....	25
2.3.2.1 Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK) .....	25
2.3.2.2 p38-MAP-Kinase .....	26
2.3.2.3 C-Jun NH <sub>2</sub> -terminale-Kinase (JNK) .....	27
2.4 Melatonin.....	29
2.4.1 Physiologische Eigenschaften.....	29
2.4.2 Einfluss von Melatonin auf das Immunsystem .....	30
2.4.3 Melatonin-Rezeptoren im Immunsystem .....	32
2.4.4 Melatonin in Inflammation und Sepsis .....	33
2.4.5 Melatoninrezeptoren und Signaltransduktion.....	35
2.5 Ziele der Arbeit .....	38
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>39</b>
3.1 Materialien.....	39
3.1.1 Geräte.....	39
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	41

3.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	42
3.1.4	Lösungen, Puffer und Medien .....	44
3.2	Methoden .....	50
3.2.1	Tierexperimentelle Methoden .....	50
3.2.1.1	Versuchstiere .....	50
3.2.1.2	Versuchsgruppen .....	51
3.2.1.3	Versuchsprotokoll.....	51
3.2.1.4	Zyklusbestimmung der Maus.....	52
3.2.1.4.1	Probengewinnung .....	52
3.2.1.4.2	Auswertung des Abstriches .....	53
3.2.1.5	Narkose.....	55
3.2.1.6	Chirurgisches Vorgehen.....	56
3.2.1.7	Beobachtungszeitraum.....	57
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	58
3.2.2.1	Leukozytenzählung .....	58
3.2.2.2	Zellzahlbestimmung .....	58
3.2.2.3	Splenozyten-Isolation .....	59
3.2.2.4	Trypanblaufärbung .....	59
3.2.2.5	Zellkultur der Splenozyten .....	59
3.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	60
3.2.3.1	Expressionsanalysen .....	60
3.2.3.1.1	Kontrolle der RNA-Qualität.....	61
3.2.3.1.2	Kontrolle der RNA-Integrität durch Agarose-Gelelektrophorese .....	62
3.2.3.1.3	DNase Verdau .....	63
3.2.3.1.4	Umschreibung in cDNA (Reverse Transkription) .....	63
3.2.3.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	64
3.2.3.1.6	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) .....	64
3.2.3.1.7	Auswertung der qRT-PCR.....	67
3.2.3.2	Proteinanalytik.....	68

3.2.3.2.1	Proteinisolation .....	68
3.2.3.2.2	Proteinbestimmung .....	68
3.2.3.2.3	Western Blot .....	69
3.2.3.3	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) .....	72
3.2.3.3.1	Funktionsprinzip .....	72
3.2.3.3.2	Durchführung .....	72
3.2.4	Software und Statistik.....	73
3.2.4.1	Verwendete Computerprogramme .....	73
3.2.4.2	Statistische Auswertung, grafische Darstellung .....	74
3.2.4.3	Web-Quellen .....	74
4	Ergebnisse .....	75
4.1	Qualitätskontrollen der molekularbiologischen Experimente .....	75
4.1.1	Qualitätskontrolle der RNA .....	75
4.1.2	Qualitätskontrolle der qRT-PCR-Reaktion .....	76
4.2	Nachweis von Melatoninrezeptoren in der Milz .....	79
4.3	Leukozyten .....	79
4.4	Bakterienkultur.....	80
4.5	Genexpressionsanalysen .....	82
4.5.1	Expressionsanalysen von TNF $\alpha$ , CXCL2 und ICAM-1 .....	82
4.5.2	Expressionsanalysen von CXCR2 und L-Selektin .....	84
4.5.3	Expressionsanalysen von IL-1 $\beta$ und IL-2.....	85
4.5.4	Expressionsanalysen von ATF3 .....	86
4.6	Western Blot.....	87
4.6.1	Expression von pAKT .....	87
4.6.2	Expression der ERK-MAPK.....	88
4.6.3	Expression der p38-MAPK .....	89
4.6.4	Expression der JNK-MAPK .....	90
4.7	ELISA.....	91
5	Diskussion.....	92

5.1	Wertung des Modells .....	92
5.1.1	Tiermodell .....	92
5.1.2	Melatoninkonzentration und Inkubationszeit .....	94
5.1.3	Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR.....	94
5.1.4	Proteinanalytik mittels Western Blot .....	96
5.1.5	Zytokin-Nachweis mittels ELISA.....	97
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	98
5.2.1	Sepsis-Untersuchung .....	98
5.2.2	Genexpressionsanalysen .....	101
5.2.2.1	Expressionsanalysen von TNF $\alpha$ , CXCL2 und ICAM-1 .....	102
5.2.2.2	Expressionsanalysen von CXCR2 und L-Selektin .....	103
5.2.2.3	Expressionsanalysen von IL-1 $\beta$ und IL-2.....	104
5.2.2.4	Expressionsanalysen von ATF3 .....	106
5.2.3	Protein-Analyse.....	108
5.2.3.1	Aktivierung von PI3/Akt .....	108
5.2.3.2	Aktivierung der MAP-Kinasen.....	109
5.2.3.3	Schlussfolgerung.....	111
6	Literaturverzeichnis .....	112
7	Publikationen / Dank.....	125
7.1	Publikationen.....	125
7.2	Dank.....	126
8	Lebenslauf.....	127

## II. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen:

Abb. 1: Zusammenhang zwischen SIRS, Sepsis und Infektion.....	17
Abb. 2: Effekte von Melatonin auf das Immunsystem .....	31
Abb. 3: Melatoninrezeptor-vermittelte intrazelluläre Signalkaskaden .....	36
Abb. 4: Zeitlicher Ablauf der Tierversuche .....	52
Abb. 5: Vaginalabstrich der Maus im Proöstrus 10x (40x) .....	53
Abb. 6: Vaginalabstrich der Maus im Östrus 10x (40x) .....	54
Abb. 7: Vaginalabstrich der Maus im Metöstrus 10x (40x) .....	54
Abb. 8: Vaginalabstrich der Maus im Diöstrus 10x (40x).....	55
Abb. 9: RNA-Gelelektrophorese .....	75
Abb. 10: Schmelzkurve nach qRT-PCR.....	76
Abb. 11: Kontrollgelelektrophoresen nach qRT-PCR .....	78
Abb. 12: Gelelektrophorese von MT1- und MT2-Rezeptor-, Gpr50.....	79
Abb. 13: Leukozytenzahl .....	80
Abb. 14: Bakterienkultur Aszites .....	81
Abb. 15: Relative Expression von TNF $\alpha$ , CXCL2 und ICAM-1 in den Therapiegruppen .....	83
Abb. 16: Relative Expression von CXCR2 und L-Selektin in den Therapiegruppen .....	84
Abb. 17: Relative Expression von IL-1 $\beta$ und IL-2 in den Therapiegruppen .....	85
Abb. 18: Relative Expression von ATF3 in den Therapiegruppen .....	86
Abb. 19: Effekt von Melatonin auf die pAKT-Aktivität.....	87
Abb. 20: Effekt von Melatonin auf die p42-Aktivität .....	88
Abb. 21: Effekt von Melatonin auf die p38-Aktivität.....	89
Abb. 22: Effekt von Melatonin auf die pJNK-Aktivität .....	90
Abb. 23: Plasmakonzentration von TNF $\alpha$ .....	91

### Tabellen:

Tab. 1: Definitionen Sepsis-Konsensuskonferenz.....	18
Tab. 2: Einteilung in Versuchsgruppen .....	51
Tab. 3: Primer für die qRT-PCR .....	66
Tab. 4: Programm zur qRT-PCR .....	67
Tab. 5: Primär-Antikörper für Western Blot.....	71

### III. Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arteria, Arterie
a.e.	am ehesten
AAAD	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
AA-NAT	Serotonin-N-Acetyltransferase
Abb.	Abbildung
ACCP	American College of Chest Physicians
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AFMK	N1-Acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramin
Akt	codierende Gene für Proteinkinase B; Ak = Eigenname eines Mausstammes, t = transforming (deutsch: umwandelnd)
AMK	N1-acetyl-5-methoxykynuramin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	Aqua destillata (deutsch: destilliertes Wasser)
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATF	Activating transcription factor (aktivierender Transkriptionsfaktor)
Bax	Bcl-2-associated X protein (deutsch: Bcl2-assoziiertes X Protein)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (deutsch: B-Zell Lymphom 2)
bp	Basenpaare
bzgl.	Bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CaBP	Calciumbindendes Protein
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate (deutsch: zyklisches Adenosinmonophosphat)
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CASP	Colon ascendens Stent Peritonitis



cDNA	complementary DNA (deutsch: komplementäre DNA)
CLI	Coecumligatur und –inzision
CLP	Coecumligatur und –punktion
Cp	crossing point (deutsch: Kreuzungspunkt) Abkürzung für Cq-Wert, der über die Methode der zweiten Ableitung bestimmt wird
Cq	cycle of quantitation (deutsch: Quantifizierungszyklus)
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
Ct	cycle of threshold (deutsch: Schwellenwertzyklus), Abkürzung für Cq-Wert, der über die Methode der Punktfestsetzung mittels einer Geraden parallel zur x-Achse bestimmt wurde
Cy <sub>0</sub>	Abkürzung für Cq-Wert, der über die Methode nicht-linearen Regression nach Richards-Funktion bestimmt wurde.
d.h.	das heißt
DC	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonucleinacid (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal-Growth-Factor (deutsch: epidermaler Wachstumsfaktor)
ERK	extracellular signal-related kinase
et al.	<i>et alii / et aliae</i>
etc.	<i>et cetera</i>
g	Gramm / Erdbeschleunigungsfaktor
G	Gauge (Maßeinheit für die Größe von Kanülen)
Gld. / Gldd.	Glandula / Glandulae (deutsch: Drüse / Drüsen)
Gpr50	G Protein-gekoppelter Rezeptor 50
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour / hours / (deutsch: Stunde / Stunden)
HEV	Hochendotheliale Venolen
HHA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HIOMT	Hydroxyindole-O-methyltransferase

HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IFN	Interferon
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (entspricht mol / l)
MAP	mean arterial pressure (deutsch: mittlerer arterieller Blutdruck)
MAPK	mitogen activated protein kinase (deutsch: mitogen aktivierte Proteinkinase)
Mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex (deutsch: Haupthistokompatibilitäts-komplex)
Min	Minute
ml	Milliliter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome (deutsch: Multiorgan-Dysfunktionssyndrom)
MOF	multiple organ failure (deutsch: Multiorganversagen)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MT	Melatonin
n	Anzahl, nano-
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (deutsch: Kernfaktor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

NO	Stickstoffmonoxid
NTC	no template control (deutsch: Kontrolle ohne Matrix)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
p38 MAPK	phospho 38 MAPK
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PALS	Periarterielle Lymphscheide
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (deutsch: Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	polymerase-chain-reaction (deutsch: Polymerasekettenreaktion)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PKB	Proteinkinase B
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PRR	Pattern-Recognition Receptor
Px	Peroxidase
QR2	Quinonreduktase 2
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase PCR (deutsch: quantitative reverse Transkriptase quantitative PCR)
Ras	<i>Rat sarcoma</i> , Proto-Onkogen
RFU	relative fluorescence units (deutsch: relative Fluoreszenzeinheiten)
RHT	Retinohypothalamischer Trakt
RNA	Ribonucleinacid (deutsch: Ribonukleinsäure)
ROR	RAR-related orphan receptor (deutsch: RAR-verwandter „verwaister“ Rezeptor)
ROS	Reactive Oxygen Species (deutsch: Reaktive Sauerstoffspezies)
Rpm	revolutions per minute (deutsch: Umdrehungen pro Minute)
Rps16	ribosomales Protein S16
RT	Raumtemperatur

---

s.c.	subcutan
SAPK	stress activated protein kinase (deutsch: stressaktivierte Proteinkinase)
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SCN	Nucleus <i>suprachiasmaticus</i>
SD	standard deviation (deutsch: Standardabweichung)
Sdha	Succinatdehydrogenase
SIRS	systemic inflammatory response syndrome (deutsch: Syndrom der systemischen inflammatorischen Antwort)
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit / units (deutsch: Einheit / Einheiten)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
V.	Vena, Vene
vgl.	Vergleiche
W	Watt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
ZVD	zentraler Venendruck
ZVK	zentraler Venenkatheter

# 1 Zusammenfassung / Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

Die pathogenetischen Grundlagen und Zusammenhänge der Sepsis sind Gegenstand intensiver Forschung. In verschiedenen Sepsismodellen konnte in der Vergangenheit ein Überlebensvorteil sowie eine Reduktion potenzieller Organschäden durch exogene Applikation des pinealen Hormons Melatonin gezeigt werden. Für diese positiven Effekte wird einerseits das starke antioxidative Potential verantwortlich gemacht, zum anderen scheint die Aktivierung membranständiger Melatoninrezeptoren (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub>) an der Organprotektion beteiligt zu sein. Mit dem ständig wachsenden Zugewinn an Wissen über Interaktionen zellulärer und humoraler Komponenten immunologischer Prozesse steigt auch das Interesse an den Auswirkungen gezielter Knockouts.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen des Melatonin-Rezeptor Knockouts auf nachgeschaltete Signalkaskaden und Zytokinproduktion mittels *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungstechniken genauer charakterisiert werden.

Bei weiblichen C3H/HeN-Mäusen wurde eine polymikrobielle Sepsis mittels Coecumligatur und –inzision (CLI) induziert. Nach einem Beobachtungszeitraum von 60 Minuten in Narkose erfolgte für molekularbiologische Untersuchungen die Entnahme der Milz. Splenozyten wurden 30 Minuten mit Melatonin oder Vehikel inkubiert und anschließend auf Veränderungen in der Genexpression und der Proteinaktivierung untersucht.

Während in den Wildtyp (WT)-Tieren keine signifikanten Veränderungen in der Aktivität der MAPK ERK, p38, JNK und der Proteinkinase Akt beobachtet wurden, führte der MT-Knockout zu einer Reduktion der protektiv wirkenden MAPK ERK und Akt. Im Gegensatz hierzu kam es zu einem deutlichen Anstieg der Stresskinase JNK, während sich die Aktivität der p38 MAPK bei basalen Werten hielt. Diese Ergebnisse ließen sich besonders ausgeprägt in den CLI-Tieren beobachten. Entsprechend konnte auch ein Anstieg in der Genexpression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsfaktoren in den KO-Tieren dargestellt werden. Dieser könnte mit einer veränderten Aktivität der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 und der Proteinkinase Akt in der Sepsis in Zusammenhang stehen.

Die gewonnenen Erkenntnisse sowie die zentrale Rolle der MAPK in der Kontrolle pro- und antiinflammatorischer Gene bestärken die Vermutung der Schlüsselrolle von

Melatonin in der Stressantwort von Immunzellen. Die vorliegenden Ergebnisse können somit als Grundlage für weitere Untersuchungen und therapeutische Ansätze mit dem Ziel der Reduzierung der hohen Sepsis-assoziierten Mortalität dienen.

## 1.2 Abstract

The pathogenic principles and relationships of sepsis are object of intensive research. In different sepsis models an improved survival and a reduction of organ damage after exogenous application of the pineal hormone melatonin has been shown in the past. On the one hand, the strong antioxidative potential is held responsible for these positive effects, on the other hand, the activation of membrane-bound melatonin receptors (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub>) seems to be involved in organ protection. With the constantly growing gain in knowledge about interactions of cellular and humoral components of immunological processes the interest in the effects of specific knockouts has risen.

In the present work the effects of melatonin receptor knockout on signal transduction cascades and production of cytokines were to be characterised by *in vitro* and *in vivo* research methods.

Female C3H/HeN mice underwent induction of polymicrobial sepsis by cecal ligation and incision (CLI). After an observation period of 60 minutes in anaesthesia the spleen was removed for molecular biological investigations. Splenocytes were incubated 30 minutes with melatonin or vehicle solution and subsequently examined for changes in gene expression and protein activation.

While in wildtype (WT) animals no significant changes in the activity of the MAPK ERK, p38, JNK and the protein kinase AKT were observed, the MT knockout led to a reduction of the protective MAPK ERK and AKT. In contrast, an increase of the stress-activated kinase JNK was obvious, while the activity of p38 MAPK kept with basal values. These results were gained most notably in the CLI animals. Accordingly, an increased gene expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in the KO animals was detected. This might be associated with the observed changes in activity of the MAP-kinases ERK1/2, JNK, p38 and the protein kinase AKT in sepsis.

The gained knowledge as well as the central role of the MAPKs in the control of pro- and antiinflammatory genes encourages the supposition of the key role of melatonin in the stress answer of immune cells. The present results may serve as basis for further investigations and therapeutic attempts with the aim of reducing the high sepsis-related mortality.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Sepsis**

#### **2.1.1 Grundlagen der Sepsis**

Trotz großer Anstrengungen und jahrzehntelanger Forschung in der intensivmedizinischen Therapie, handelt es sich bei der Sepsis bzw. dem septischen Schock und die mit ihm einhergehenden Komplikationen immer noch um Krankheitsbilder mit steigender Inzidenz und der Haupttodesursache auf Intensivstationen [1]. Ein Großteil der Betroffenen leidet unter schweren Organdysfunktionen welche häufig in einem Multiorganversagen enden. Laut einer repräsentativen Multicenter-Studie des Kompetenznetzwerks Sepsis (SepNet) aus dem Jahr 2007 erkrankten jährlich etwa 75.000 Menschen in Deutschland (110 von 100.000) an einer schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock. Dabei erlagen 54 % der beobachteten Erkrankten den Folgen der Erkrankung. Mit insgesamt 154.000 Erkrankten stellt die Sepsis somit die siebthäufigste Entlassungsdiagnose der lebensbedrohlichen Erkrankungen dar [2].

Bei der Sepsis handelt es sich um eine komplexe systemische und überschießende Entzündungsreaktion des Organismus, hervorgerufen durch Invasion pathogener Keime in die Blutbahn durch Überwinden der natürlichen Endothelbarriere [3].

Trotz der engen Verknüpfung des Begriffs Sepsis mit der modernen Intensivmedizin, handelt es sich um einen sehr alten medizinischen Ausdruck. Im Verlauf der Jahre hat die Begriffsbestimmung der Sepsis jedoch Variationen erfahren. Schon bei Hippokrates (ca. 460 - 370 v. Chr.) finden sich erste Beschreibungen einer Infektion. Der Begriff leitet sich von dem griechischen Wort σήπω ("faul machen") ab. Hierdurch wird die klinische Symptomatik der „Fäulnis des Blutes“ (Septikämie) im Endstadium der Erkrankung eindrücklich beschrieben. Die erste klinisch-infektiologische Begriffsdefinition entstand jedoch knapp 100 Jahre später. Erst nachdem Louis Pasteur (1822 – 1895) in seinen Arbeiten über Fäulnis und Verwesung Bakterien als Krankheitserreger entdeckte, lieferte der Internist Schottmüller 1914 in seinem Artikel „Wesen und Behandlung der Sepsis“ in den „Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin“ die noch heute gültige Definition der Sepsis:



*„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitsbeschwerden ausgelöst werden [4]“.*

Nach heutigem Verständnis handelt es sich bei der Sepsis um „...die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ [5].

Zur Vereinheitlichung der Begriffe wurde schließlich 1992 in einer Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine (ACCP / SCCM) die aktuell gültige Definition der Sepsis, sowie deren Diagnosekriterien verabschiedet [6]. Sie nimmt zusätzlich den Hinweis auf die Pathogenese in ihre Definition mit auf. Da die Bezeichnung Sepsis bzw. septischer Schock erst dann zutreffend ist, wenn es neben einer Bakteriämie bzw. Endotoxinämie zu schweren Entzündungsreaktionen mit Beeinträchtigung lebenswichtiger Organe kommt, wurde das Krankheitsbild der Sepsis schließlich als eine systemische Entzündungsantwort („systemic inflammatory response syndrome, SIRS“) des Körpers auf eine Infektion definiert [6, 7] (Abb.1, Tab.1).

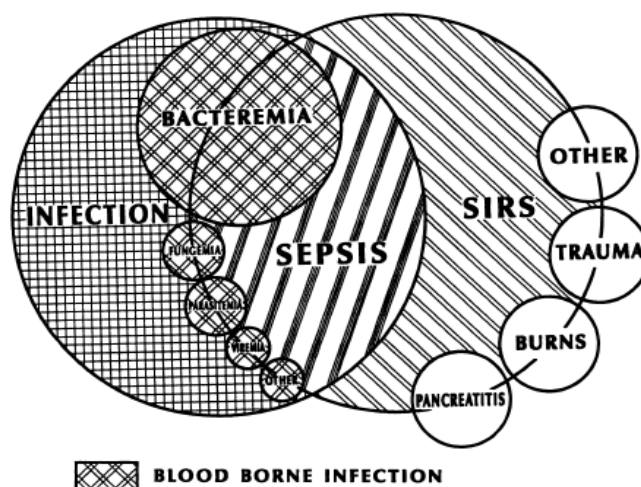


Abb. 1: Zusammenhang zwischen SIRS, Sepsis und Infektion, nach Bone *et al.* [6]

Tab. 1: Definitionen Sepsis-Konsensuskonferenz: SIRS, Sepsis, Schwere Sepsis, Septischer Schock [6]

**SIRS** („systemic inflammatory response syndrome“):

systemische Immunantwort auf nicht-infektiöse Ereignisse, wobei mindestens zwei der folgenden Bedingungen erfüllt sein müssen:

- Körpertemperatur       $> 38^{\circ}\text{C}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz             $> 90$  / Min.
- Atemfrequenz            $> 20$  / Min. oder  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg
- Leukozyten               $> 12.000$  /  $\text{mm}^3$  oder  $< 4000$  /  $\text{mm}^3$  oder  $> 10\%$  unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild

**Sepsis:**

SIRS mit gleichzeitigem Nachweis oder klinisch begründetem Verdacht auf eine Infektion

**Schwere Sepsis:**

Sepsis mit gleichzeitigem Nachweis einer Organdysfunktion, arterieller Hypotension oder Minderperfusion

**Septischer Schock:**

Der Patient erfüllt die Bedingungen einer Sepsis. Trotz adäquater Volumentherapie besteht eine Hypotonie ( $\text{RR}_{\text{sys}} < 90$  mmHg). Es können Perfusionsstörungen auftreten, welche sich als Oligurie, Laktatazidose oder Enzephalopathie manifestieren.

## 2.1.2 Pathophysiologie der Sepsis

Die Pathophysiologie der Sepsis ist sehr komplex und trotz großer Anstrengungen immer noch nicht vollkommen verstanden. Allgemeine Übereinstimmung besteht jedoch in der Vorstellung, dass es sich dabei um eine unkontrollierte Entzündungsantwort des Wirtes auf eine Infektion handelt.

Die entscheidende Rolle in der Genese spielt das Zusammenwirken von Infektion und Immunantwort. Prinzipiell sind alle Erreger in der Lage eine Sepsis zu triggern. In den meisten Fällen handelt es sich jedoch um gram-positive (44%) und gram-negative Bakterien (57%) [8]. Aber auch Pilzinfektionen (11%) und zu einem geringen Anteil virale Erreger können eine Sepsis verursachen [8].

Eine Infektion mit oben genannten Erregern führt zu einer Aktivierung des Immunsystems, einschließlich des Komplementsystems und der Gerinnungskaskade. Es kommt zur Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren, wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aus endo- und epithelialen Zellen, sowie aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Akute-Phase-Proteine werden induziert und durch Aktivierung des Komplementsystems die Anaphylatoxine C3a und C5a exzessiv freigesetzt. Diese primäre Entzündungsantwort ist somit in der Lage sich selbst aufrecht zu erhalten. Sie wird allerdings durch sekundäre Mediatoren zusätzlich gefördert. Gleichzeitig startet eine entgegengerichtete Antwort des Organismus. Antiinflammatorische Mediatoren, wie IL-4, IL-10 und IL-1-Rezeptorantagonisten werden sezerniert und schließlich der kontrollierte Zelltod aktivierter Immunzellen eingeleitet [9].

Durch die überstimulierte Antwort des Organismus werden weitere Entzündungswege induziert, die zu einer Schädigung verschiedenster Organfunktionen führen. Die Expression von Thromboplastin auf Monozyten, Neutrophilen und endothelialen Zellen steigt an, Gerinnungskaskaden werden initiiert und antikoagulatorische Faktoren werden inhibiert. Dies führt zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) [10]. Es kommt zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von endothelialen Zellen. Durch den Kontakt mit zirkulierenden Leukozyten werden diese aktiviert, was schließlich zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, dem sog. oxidativen Burst, führt. Mithilfe dieser Sauerstoffradikale gelingt es neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, eingedrungene Pathogene effektiv zu zerstören. Allerdings kommt es dabei auch zu Schäden des umgebenden Endothels und Gewebe. Dadurch steigt die Gefäßpermeabilität, was zu einem erheblichen Verlust von intravasalem Volumen in den interstitiellen Raum führt und schließlich in einem hypovolämen Schock resultiert. Das durch Induktion der endothelialen NO-Synthase entstehende Stickoxid (NO) bewirkt eine arterielle Hypotension und verstärkt somit zusätzlich den entstandenen Volumenverlust.

Häufig wird die Sepsis von einer Kardiomyopathie mit sinkender Kontraktilität und reduziertem Herzzeitvolumen (HZV) begleitet. Auch die endokrine Regulation scheint beeinträchtigt, was sich in einer relativen Nebennierenrindeninsuffizienz und einer

inadäquaten Vasopressin-Sekretion bestätigt. Diese schwerwiegenden Störungen der Mikrozirkulation und der Organperfusion begünstigen die Entwicklung eines Multiorganversagens (MOF), welche die häufigste Todesursache septischer Patienten darstellt [11].

Früher als alleinige Ursache für die Entwicklung einer Sepsis und Organdysfunktion betrachtet, geht man seit den 90er Jahren davon aus, dass der initialen Phase, welche durch eine Hyperinflammation (SIRS) charakterisiert ist, eine zweite Phase mit exzessiver Gegenregulation und überschießender Antiinflammation folgt. Als Konsequenz dieses biphasischen Verlaufs ergibt sich schließlich eine zelluläre Anergie und damit eine Immunparalyse bzw. Immunsuppression. Dieser Zustand wird als Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS) bezeichnet und begünstigt die Entstehung septischer Komplikationen.

Aufgrund der äußerst schlechten Prognose unterstreicht die Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. in ihrer S-2k-Leitlinie von 2010 die Wichtigkeit der frühen Detektion klinischer Zeichen der Sepsis, der Identifikation und Sanierung des Fokus kombiniert mit einer frühen Einleitung einer Antibiotikatherapie, einschließlich einer supportiven Therapie, mit dem Versuch die Organdysfunktion zu verhindern [7].

### **2.1.3 Peritonitis als Sepsisursache**

Die häufigste Form der intraabdominellen Infektion stellt die sekundäre Peritonitis dar. Zu den Ursachen zählen v.a. die perforierte Appendizitis, Magen- bzw. Duodenalulzera, sowie perforierte Colonanteile durch Divertikulitis und maligne Prozesse.

Je nach Ausmaß und Lage der Perforation kommt es zum Übertritt von Darminhalt in die freie Bauchhöhle. Dadurch entsteht zunächst eine lokal begrenzte Entzündung des Peritoneums, die nach Erschöpfung der lokalen Abwehr zu einer diffusen Peritonitis führt.

Das Peritoneum, als seröse Haut, kleidet mit einer Gesamtfläche von ca. 1,7 m<sup>2</sup> die Peritonealhöhle aus. Dabei funktioniert es weitgehend wie eine semipermeable Membran, welche einen bidirektionalen Austausch von Flüssigkeit und

kleinmolekularen Substanzen ermöglicht. Die Sekretion und Reabsorption von Peritonealflüssigkeit erfolgt über kleinste Stomata zwischen den Mesothelzellen. An diesen Stellen ist die Basalmembran gefenstert, was den Weitertransport zu den subepithelialen Lymphkapillaren ermöglicht. Durch kontraktile Aktinfilamente der Mesothelzellen sind diese Stomata elastisch und ihre Größe regulierbar. Im Falle einer Peritonitis kommt es zur Umkehrung der Barrierefunktion [12]. Die Porengröße nimmt zu, das Peritoneum wird durchlässiger, auch für Bakterien im Sinne einer Translokation aus dem Darmlumen in den Bauchraum, und führt somit zu einer vermehrten Absorption von Peritonealflüssigkeit über die Lymphbahnen [13].

Neben der unspezifischen Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten kommt es im Rahmen einer intraabdominellen Infektion schließlich auch zu spezifischen Immunantwort durch Stimulation von Lymphozyten des MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) [14].

## 2.2 Die Milz und das Immunsystem

Die Milz nimmt eine Sonderstellung in der Immunabwehr ein. Neben der Tatsache, dass sie pro Tag in etwa die gleiche Menge an Lymphozyten aufnimmt wie die restlichen lymphatischen Gewebe zusammen, findet sich bei der Milz die Besonderheit, dass sie mit großen Gefäßen direkt in das Blutkreislaufsystem eingebaut ist. Mit einem Blutfluß von ca. 200 – 300 ml / min / 100g Körpergewicht stellt es den größten Blutfilter des Körpers dar [15].

Im Rahmen ihrer Funktion in der Infektabwehr und der Zellmauserung lässt sich die Milz in zwei unterschiedliche Abschnitte gliedern: die weiße und die rote Pulpa.

- Die weiße Pulpa (25 % der Pulpa) stellt das lymphatische Gewebe der Milz dar, welches für die adaptive Immunantwort verantwortlich ist und B- und T-Zell-Bereiche enthält. Die T-Zell-Region stellen dabei die um die Zentralarteriolen angeordneten periarteriellen Lymphozytenscheiden (PALS) dar. Hier erfolgt die Interaktion zwischen dendritischen Zellen (DC's) und passierenden B-Zellen. Weiterer Bestandteil sind die weißlichen Milzknötchen (Malthigi-Körperchen), bei denen es sich um Lymphfollikel, also B-Zell-Regionen handelt. Hier findet die klonale Expansion aktivierter B-Zellen statt.

- Die rote Pulpa (75 % der Pulpa) besteht aus Pulpasträngen und den Milzsinus, welche einem offenen Blutsystem entsprechen. Diese werden von dünnen retikulären Strängen mit zahlreichen Makrophagen durchzogen, welche gealterte bzw. strukturell veränderte Erythrozyten und Thrombozyten herausfiltern. Hier befinden sich auch Antikörper-produzierende Plasmazellen, welche nach ihrer Differenzierung aus der weißen in die rote Pulpa wandern.

Getrennt werden diese beiden Bereiche durch die Marginalzone. Sie entspricht einer Transitzone für Zellen die den Blutstrom verlassen und in die weiße Pulpa einwandern. Vermutlich entspricht dieser aktive Prozess der Transmigration, welche bereits für die Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe beschrieben wurde [16]. Die wahrscheinlich wichtigste Funktion dieser gefäßreichen Zone besteht allerdings in der raschen Detektion zirkulierender Antikörper und ihrer Präsentation an splenische Lymphozyten. Durch die außergewöhnliche Struktur der Milz fließt annähernd das gesamte Blutvolumen durch die Marginalzone und entlang der weißen Pulpa. Dies ermöglicht dem Immunsystem eine ständige Kontrolle des zirkulierenden Blutes.

Indem beide Immunantworten, angeborene als auch erworbene, in der Milz parallel ablaufen, stellt dieses Organ eine wichtige Funktion in der Immunhomöostase dar. Während die weiße Pulpa ausschließlich an der erworbenen Immunität beteiligt ist, scheint die Marginalzone durch ihre spezifischen Makrophagen und B-Zellen in die angeborene sowie in die erworbene Immunität involviert zu sein. Die Expression spezifischer Rezeptoren auf residenten Zellen in der Marginalzone ermöglicht eine effektive Detektion zirkulierender Pathogene bzw. Antigene [17]. B-Zellen können zum einen durch Makrophagen oder auch durch direkten Kontakt mit dem Antigen aktiviert werden. Nach Aktivierung in der Marginalzone wandern diese in die weiße Pulpa, insbesondere in die T-Zell-Zone, ein und fungieren dort als potente Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Dieser Schritt ist entscheidender Faktor in der Initiation der erworbenen Immunantwort.

Weiterhin dient die Milz laut Swirski *et al.* als Reservoir für naive, undifferenzierte Monozyten [18]. Ihr Anteil an der Gesamtmasse der Monozyten übersteigt den zirkulierenden Teil um ein weites. Sie befinden sich getrennt von DCs und Makrophagen in Gruppen in der subkapsulären roten Pulpa. Als Reaktion auf eine

Inflammation werden diese splenischen Monozyten aktiviert, verlassen die Milz und wandern in Massen in das Entzündungsgebiet ein [18].

Eine Stimulation mit LPS zeigte vielfältige Reaktionen, zu denen eine Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen, Aktivierung von Lymphozyten und eine vermehrte Produktion von parakrinen Substanzen wie IL-1 $\beta$ , NO und Produkten aus dem Arachidonsäure-Stoffwechsel gehören. Dies führt zu einer Hemmung des sympathischen Vasokonstriktor-Tonus an den postganglionären Synapsen der Milz. Währenddessen bleiben die Durchblutung anderer parenchymatöser Organe im Kreislauf sowie das Herzzeitvolumen unverändert. Dadurch kommt es zu einer Steigerung des splenischen Blutflusses auf das bis zu 2,5-fache der Ruhedurchblutung [19]. Hieraus resultiert eine erhöhte Aufnahme von zirkulierenden Leukozyten und Antigen-präsentierende Zellen (APCs) aus dem Blut. Eine generelle Vasodilatation im Blutkreislauf, wie sie beim septischen Schock vorkommt, führt dagegen zu einer Umverteilung des Blutvolumens auf Kosten der Milzdurchblutung und wirkt sich nachteilig auf die Zellaufnahme in dieses Organ aus.

## **2.3 Reizweiterleitung über Signalkaskaden im Immunsystem**

Alle intrazellulären Prozesse werden durch ein komplexes Netzwerk von verschiedenen Signalwegen eng kontrolliert. Jeder dieser Signalwege besteht aus mehreren interagierenden Molekülen und führt zur Aktivierung oder Suppression spezifischer Prozesse auf Transkriptionsebene. Zusätzlich finden sog. „*crosstalks*“ [20], Interaktionen zwischen den einzelnen Wegen, statt. Durch die Möglichkeit Kaskaden durch Inhibitoren verschiedener Schlüsselmoleküle zu blockieren, sind diese Zell-Signalwege immer mehr zum Hauptaugenmerk aktueller Forschung und Entwicklungen in der Pharmakotherapie geworden.

Das Immunsystem kann durch die Aktivierung einer Vielzahl unterschiedlicher Signalwege beeinflusst werden. Im Folgenden werden die für diese Arbeit Relevanten näher erläutert.

### 2.3.1 PI3K/Akt

Der PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) / Akt (auch PKB, *protein kinase B*)-Signalweg ist in die Regulation von zahlreichen zellulären Prozessen wie Proliferation, Metabolismus, Migration und Apoptose involviert und nimmt damit eine herausragende Bedeutung in der Steuerung von Zellwachstum und Überleben ein [21]. Weiterhin scheint er, durch Regulation des LPS-Signalwegs, in die Immunantwort involviert zu sein [22].

Die Stimulation des PI3K/Akt-Weges führt über Tyrosinkinaserzeptoren, TLRs oder über die membrangebundenen GTPase Ras zur Aktivierung von PI3-Kinasen [23]. PI3Ks katalysieren die Phosphorylierung bestimmter Phospholipide der Zellmembran, sog. Phosphatidylinositole. Diese aktivierten Membranlipide stellen wichtige *second messenger* intrazellulärer Signalwege dar. Somit führt die aktivierte PI3K durch Konvertierung des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) zu Umstrukturierungen in der Zellmembran. Unter der Anwesenheit von PIP<sub>3</sub> wird die Kinase Akt zur Plasmamembran rekrutiert, verankert und durch zweifache Phosphorylierung aktiviert. Dabei bildet Akt das zentrale Enzym innerhalb des Signalweges und besitzt bis zu 100 unterschiedliche Substrate.

Einer der bekanntesten Effekte des PI3K/Akt-Signalweges stellt die direkte Blockierung des programmierten Zelltods dar. Durch Bindung von Akt an Bax (Bcl-2-associated X protein) wird das proapoptotische Protein inaktiviert und verhindert damit die Freisetzung von Cytochrom C, was in der Abwesenheit von Akt zur Apoptose führen würde [24].

Ergebnisse von Studien zur Funktion des PI3K/Akt-Signalweges in der Sepsis erscheinen teilweise kontrovers. So wurde bereits von einer positiven, als auch negativen Regulation inflammatorischer Parameter berichtet. Schabbauer *et al.* demonstrierten, dass eine Hemmung der PI3K zur gesteigerten LPS-induzierten Inflammation führt und das Überleben septischer Mäuse signifikant reduziert [25]. Darüber hinaus verringerte die Aktivierung des PI3K/Akt-Weges die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Expression in humanen PBMCs [22]. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf eine Rolle des PI3K/Akt-Signalweges in der Regulation der LPS-induzierten Genexpression *in vitro* und *in vivo* hin. Die genauen Mechanismen,



welche zur unterschiedlichen Expression proinflammatorischer Zytokine, wie TNF $\alpha$ , führen, sind bisher jedoch nur unvollständig verstanden.

### **2.3.2 MAP-Kinase Wege**

Die Aktivierung der klassischen MAPK-Kaskade [26] läuft prinzipiell in drei Schritten ab und gilt für alle Mitglieder der MAPK-Familie. Als Aktivatoren der spezifischen MAP-Kinasen fungieren dabei die MAPK-Kinase (MAPKK oder MKK), welche ihrerseits durch eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK oder MAP3K) durch Phosphorylierung aktiviert werden [20]. Als Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Proteinkinasen, aktivieren MAPK zahlreiche weitere Proteinkinasen, nukleäre Proteine und Transkriptionsfaktoren. Die schnelle Aktivierung der MAPK-Kaskade ermöglicht Zellen eine gezielt regulierte Antwort auf Veränderungen.

#### **2.3.2.1 Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK)**

ERKs wurden als erstes Mitglied der MAPK-Familie identifiziert. Hiervon existieren zwei Isoformen, ERK1 und ERK2, welche gewöhnlich als ERK 1/2 bezeichnet werden [27]. ERK ist hauptsächlich in die Proliferation, Transformation und Differenzierung involviert [27].

In Immunzellen wird die ERK MAPK-Kaskade konstitutiv exprimiert [28, 29]. Es wird vermutet, dass sie eine maßgebliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase spielt. Durch ihre Aktivierung wird die Expression der Gene reguliert, welche eine Initiation der Apoptose verhindern.

Aktiviert wird die Kaskade durch zahlreiche Mitogene, wie z.B. epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor und Thromboxan A2 [30]. Zusätzlich wird ERK als Antwort auf Endotoxin, oxidativen Stress, platelet activating factor (PAF) und Adhärenz von Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen aktiviert. Diese Phosphorylierung ist Voraussetzung für die entstehende proinflammatorische Komponente von Monozyten und Makrophagen, welche zu einer dysregulierten inflammatorischen Zytokinproduktion in der Sepsis führt.

Auch in der Rekrutierung von Leukozyten zum Ort der Entzündung spielt ERK eine entscheidende Rolle. So wird die Bindung von Leukozyten an ihren Liganden P-

Selektin und somit die Adhäsion an das vaskuläre Endothel durch ERK vermittelt [31].

ERKs können allerdings auch unabhängig von der MAPK-Kaskade aktiviert werden. Eine wichtige Rolle in der Entzündungsantwort spielen dabei proinflammatorische Stimuli wie Zytokine und PAMPS welche über Toll-like-Rezeptoren (TLR) bzw. PRRs Signale von außen vermitteln [32].

So konnte in mononukleären Zellen septischer Ratten gezeigt werden, dass eine exzessive Stimulation des MAPK/ERK – Weges zu einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren) führt [33]. Die Aktivierung von PPAR $\gamma$  spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Entzündungsantwort, indem er die Produktion inflammatorischer Mediatoren hemmt und somit das Überleben im septischen Schock verbessert [34]. Obwohl ERK in allen Immunzellen nachgewiesen werden konnte, sind die genauen Funktionen noch nicht abschließend geklärt.

### **2.3.2.2 p38-MAP-Kinase**

Die Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) p38 wird als Antwort auf zahlreiche extrazelluläre Stimuli wie physiologischer Stress, Endotoxine und proinflammatorische Zytokine aktiviert [35]. Über Tyrosinkinaserezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wird das Signal ins Zellinnere geleitet.

Bisher wurden fünf Isoformen der p38-Gruppe identifiziert: p38 $\alpha$  (SAPK2), p38 $\beta$ , p38 $\beta$ 2, p38 $\gamma$  und p38 $\delta$  (SAPK3) [36]. Die Aktivierung von p38 hat zahlreiche biologische Wirkungen. Gut dokumentiert ist die proinflammatorische Wirkung des p38-Pathways [37]. Durch inflammatorische Stimuli wie Endotoxin, TNF, PAF und IL-1 wird in Zellen der angeborenen Immunabwehr die Aktivierung der p38-MAPK initiiert [36]. Obwohl p38 für die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in Immunzellen essentiell ist, scheint eine unregulierte und prolongierte Aktivierung von p38 kritisch für die Entwicklung einer Immunsuppression zu sein. Durch Freisetzung von IL-10 und Expansion der immunsuppressiv wirkenden T<sub>H2</sub>-Lymphozyten wird die typische späte Phase der Sepsis eingeleitet.

Ähnlich der ERK spielt auch p38 eine wichtige Rolle in der Leukozyten-Migration. So führt die durch TNF $\alpha$  induzierte Aktivierung der MAP-Kinase zu einer Hochregulation der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und VCAM-1 auf Endothelzellen. Dies führt zum Leukozyten-Rollen mit Adhäsion und somit zur Initiation der Diapedese [38]. Außerdem scheint p38 für die Entwicklung des oxidative Burst und für die nachfolgende Degranulation der Neutrophilen mitverantwortlich zu sein. Erst kürzlich publiziert wurde die Tatsache, dass sowohl p38 als auch ERK MAPK verantwortlich für die durch ROS induzierte Bildung der „neutrophil extracellular traps“ (NETs) seien [39]. Durch Regulation der Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-Produktion vermittelt p38 zusätzlich die T-Zell-Differenzierung [40].

Durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 kommt es zur Hochregulation zahlreicher proinflammatorischer Proteine. Weitere Publikationen deuten darauf hin, dass die durch LPS-induzierte Aktivierung von Sp1 in Makrophagen und die nachfolgende Transkription des antiinflammatorischen IL-10 durch p38-MAPK reguliert werden [41]. Weitere antiinflammatorische Wirkungen werden über die subsequentielle Phosphorylierung des Hitzeschockproteins-27 (HSP-27) bewirkt [42]. HSP-27 als Aktin-bindendes Protein unterstützt die Reparatur des Zytoskeletts und verhindert die Einleitung der Apoptose.

### **2.3.2.3 C-Jun NH<sub>2</sub>-terminale-Kinase (JNK)**

JNK wurde erstmals als 54 kDa Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) aus Rattenlebern isoliert. Ähnlich wie p38, wird JNK durch zahlreiche Stimuli wie Lipopolysaccharid [43] und proinflammatorische Zytokine [44] aktiviert. JNK-Proteinkinasen werden durch drei Gene kodiert, wobei JNK1 und JNK2 durch alternatives Splicing in weitere Isoformen unterteilt werden können. Während JNK1/2 ubiquitär exprimiert werden, scheint JNK3 nur in Herz, Hirn und Hoden vorhanden zu sein.

JNK1 und JNK2 haben sowohl komplementäre, überlappende als auch individuelle Funktionen. So zeigten Mäuse, denen eine der beiden Isoformen fehlt, zwar keine morphologischen Unterschiede, dennoch wiesen sie schwerwiegende Defekte in T-Zell Funktionen auf, mit der Folge einer Immundefizienz [45]. Eine Aktivierung der

JNK-Signalkaskade durch Entzündungsmediatoren führte zur Sekretion von IL-2 und TNF $\alpha$  [46], sowie zur Proliferation und Differenzierung von Thymozyten.

Wie ERK und p38 hat JNK ein breites Spektrum von Substraten. Allgemein führt die Phosphorylierung durch die MAPK zur raschen Expression der c-jun-, junB- c-fos-, und ATF-2-Gene („immediate early genes“) und zur anschließenden Modulierung der Transkription von AP-1 Zielgenen [47]. Aktiviertes AP-1 führt, ähnlich p38, zur Hochregulation des Adhäsionsmoleküls E-Selektin auf Endothelzellen.

JNK greift zum einen in apoptotische Prozesse regulierend ein, ist zum anderen aber auch in Prozesse involviert, die das Überleben einer Zelle sichern. Hierbei erscheint die genaue Wirkung jedoch komplex. So konnten bereits proapoptotische [48] als auch antiapoptotische [49] Funktionen der aktivierten JNK-Kinase nachgewiesen werden. Vermutlich wird die Apoptose-Induktion abhängig von Zelltyp und Stimulus moduliert [50]. Somit übernimmt JNK bei der Entscheidung von Apoptose oder Überleben einer Zelle eine duale Funktion [43].

Zusammenfassend spielen die PI3K / Akt- und MAP-Kinase-Signalwege eine wesentliche Rolle in der Kontrolle der Entzündungsantwort. Obwohl der Status der Inflammation durch Hyperaktivierung und Immunsuppression variiert, würde eine frühzeitige Diagnose des aktuellen Zustandes die Prognose verbessern. Obwohl die kompletten Zusammenhänge und Funktionen intrazellulärer Signalkaskaden noch längst nicht alle verstanden sind, scheinen Statusanalysen der einzelnen MAPK das Potential zu besitzen Hochrisikopatienten für SIRS, ARDS und MODS zu identifizieren, um frühzeitig spezifische Therapien einzuleiten.

## 2.4 Melatonin

### 2.4.1 Physiologische Eigenschaften

Bereits 1917 entdeckten McCord und Allen, dass die Zufütterung des Extrakts der pinealen Drüse zu einer dramatischen Hautbleichung von Kaulquappen führte [51]. 1958 schließlich gelang es dem amerikanischen Hautarzt Aaron B. Lerner und seinen Mitarbeitern der Yale Universität auf der Suche nach einem Medikament gegen Vitiligo diese Substanz aus dem Pinealorgan von Rindern zu isolieren und knapp ein Jahr später seine Struktur aufzuklären. Dabei beobachtete Lerner, dass sich Melanophoren aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* durch Kontakt mit Melatonin zusammenziehen [52]. Diese Melanin-aggregierende Wirkung führte zum Namen *MelaTonin* (*mélas*, gr. für schwarz und *-tonein*, gr. für Tonus).

Melatonin gilt als Hauptprodukt des Pinealorgans. Chemisch ist es ein biogenes Amin mit Tryptaminstruktur, N-[2-(5-Methoxyindol-3-yl)ethyl]acetamid, welches bereits in nahezu allen Lebensformen nachgewiesen wurde [53].

Die Biosynthese von Melatonin gelingt tageszeit- und lichtabhängig über Serotonin aus Tryptophan. Tryptophan, als essentielle, proteinogene Aminosäure, wird aus dem Blut aufgenommen und über vier enzymatische Schritte, der mitochondrialen Tryptophan-Hydroxylase (TPH), 5-Hydroxy-Tryptophan-Decarboxylase (AAAD), Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (AA-NAT) und Hydroxyindol-O-Methyl-Transferase (HIOMT) zum Endprodukt konvertiert.

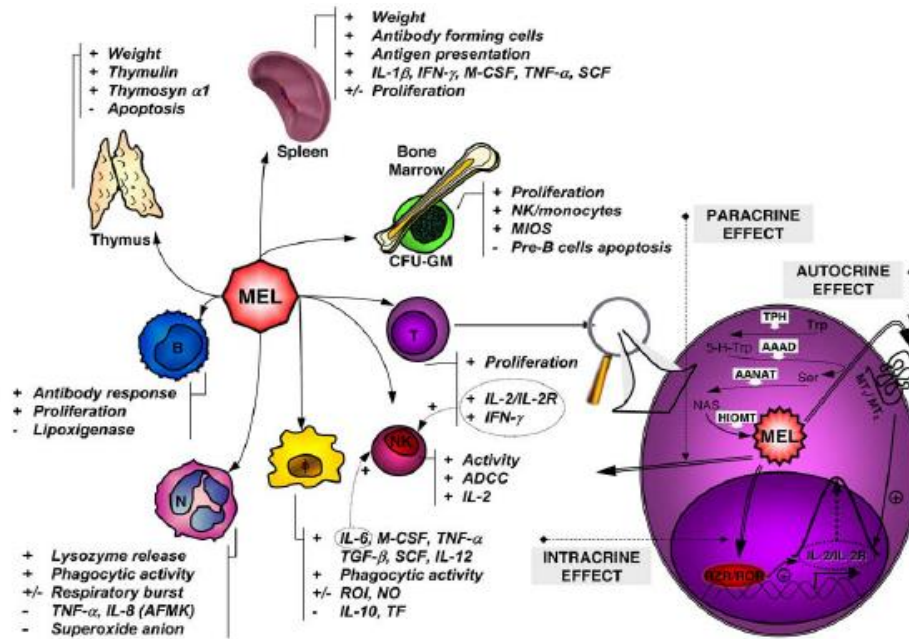
Die zirkadiane Rhythmik der Melatonin-Produktion wird durch die Vernetzung photosensitiver Ganglienzellen der Retina mit dem *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) über den retinohypothalamischen Trakt (RTH) ermöglicht. Der im ventralen Hypothalamus liegende SCN leitet schließlich als zentraler Oszillator seine Information über sympathische efferente Bahnen zur Epiphyse.

In seiner Funktion als „Chronobiotikum“ erfolgt die Sekretion direkt proportional zur Dauer der Nacht und vermittelt dadurch die zirkadiane Rhythmik. Weiterhin ist die tägliche Melatonin-Ausschüttung als efferentes Hormon-Signal an periphere Zellen außerhalb des ZNS zu verstehen [54]. Herausragende Bedeutung wurde Melatonin auch in der Regulation der Immunmodulation, Reproduktion, des Tumorwachstums sowie am Alterungsprozess zugeschrieben [55].

Neben dem Hauptproduktionsort in der Epiphyse wurde die Melatoninsynthese auch in zahlreichen extrapinealen Organen wie dem Gastrointestinaltrakt [56], der Retina [57], den Testes [58], der Haut [59], der Plazenta [60], dem Knochenmark [61] sowie dem Immunsystem [62] nachgewiesen. Allerdings scheint diese „periphere“ Melatonin-Produktion weniger zur zirkadianen Rhythmik beizutragen, sondern vielmehr lokal von den Geweben selbst als protektiver Mechanismus gegen oxidativen Stress genutzt zu werden [62].

#### **2.4.2 Einfluss von Melatonin auf das Immunsystem**

In den letzten Jahren berichteten zahlreiche Forschungsgruppen über mögliche Verbindungen zwischen Melatonin und dem Immunsystem [63-65] (Abb. 2). Dabei konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Melatoninproduktion und zirkadianen bzw. jahreszeitlichen Veränderungen im Immunsystem beobachtet werden [66]. Entsprechend führte eine Hemmung der Melatoninsynthese zu einer Beeinträchtigung der zellulären und humoralen Immunantwort [67]. Weiterhin wurde eine zirkadiane Rhythmik in der Zytokinproduktion [68], sowie in der Aktivität splenischer natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) [69] beschrieben. Auch die Beobachtung, dass menschliche PBMCs biologisch relevante Mengen von Melatonin synthetisieren [62] weist auf eine mögliche intra- und parakrine Rolle von Melatonin auf das Immunsystem hin.



**Abb. 2: Effekte von Melatonin auf das Immunsystem, nach Carrillo-Vico *et al.* [65]**

B-Zellen (B), Granulozyten und Monozyten colony-forming-unit (CFU-GM), Melatonin (MEL), Neutrophile (N), NK-Zellen (NK), T-Zellen (T).

Die Verabreichung von Melatonin führte in mehreren *in vivo* und *in vitro* Studien zu einer gesteigerten Aktivität des Immunsystems. So führten tägliche Injektionen zu einer Milzhypertrophie [70] und einer Gewichtszunahme des Thymus [71]. Außerdem konnte eine regulierende Funktion auf die Zytokinproduktion beobachtet werden. Entsprechend zeigten Melatonin-behandelte murine Splenozyten eine gesteigerte mitogene Antwort auf LPS mit erhöhter Genexpression proinflammatorischer Zytokine, wie, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  [72]. Weiterhin konnte nach Behandlung mit Melatonin eine vermehrte Antigen-Präsentation von Milzmakrophagen mit gleichzeitig gesteigerter MHC II Expression beobachtet werden. Durch eine vermehrte IL-2-Produktion führt Melatonin außerdem zu einer Aktivierung von T<sub>H1</sub>-Zellen [73].

Obwohl die genauen Mechanismen der Melatonin-Wirkung auf das Immunsystem noch nicht komplett verstanden sind, scheint es in die Regulation der Genexpression zahlreicher Zytokine in lymphatischem Gewebe involviert zu sein.

### 2.4.3 Melatonin-Rezeptoren im Immunsystem

Melatonin-Bindungsstellen wurden sowohl in der Zellmembran [74], im Zytosol [75], als auch im Zellkern [76] von zahlreichen lymphatischen Geweben lokalisiert.

Durch Forschungen mit Radioliganden, wie 2-[<sup>125</sup>I]Iodomelatonin (<sup>125</sup>I-Mel), konnten zwei spezifische Membranrezeptoren anatomisch lokalisiert, pharmakologisch charakterisiert und anschließend kloniert werden: MT<sub>1</sub>- [77] und MT<sub>2</sub>-Rezeptor [78]. Während die beiden membranständigen MT<sub>1</sub>- und MT<sub>2</sub>-Rezeptoren G-Proteingekoppelt sind, wurde der später entdeckte MT<sub>3</sub>-Rezeptor als Homolog der zytosolischen, humanen Chinon-Reduktase 2 (QR2) identifiziert [79]. Dabei wird eine Hemmung der QR2 durch Melatonin mit protektiven Effekten durch antioxidative Wirkung in Verbindung gebracht.

In Folge seiner Membranpermeabilität kann Melatonin auch über intrazelluläre Bindungsstellen seinen Einfluss ausüben. So gibt es Belege für eine Bindung von Melatonin an Calciumbindende Proteine (CaBPs) wie Calmodulin und Calreticulin [80]. Auch mit nukleären Rezeptoren wurden Interaktionen beschrieben: dem retinoiden Z-Rezeptor (RZR) und dem Retinolsäure-verwandten Orphan-Rezeptor (ROR) [81]. Diesen Mitgliedern der RZR/ROR-Rezeptor-Subfamilie wird eine herausragende Rolle in der Regulation der Transkription, der Zelldifferenzierung und in der Immunmodulation [82] durch Melatonin zugeschrieben.

Wichtige Voraussetzung für eine mögliche Wirkung von Melatonin auf das Immunsystem stellt das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen in Organen und Zellen des Immunsystems dar. So konnte bereits mit Hilfe von Rezeptoragonisten in Milz und Thymus [83], auf humanen Lymphozyten [84] und murinen Peritonealmakrophagen [85] der Nachweis von Melatoninrezeptoren erbracht werden. Durch große Fortschritte in der Molekularbiologie folgte schließlich die Detektion von Rezeptor-mRNA und -Protein in PBMCs [86] sowie in T- und B-Lymphozyten in Thymus und Milz [87].

Welcher Rezeptor jedoch in welche Immunantwort involviert ist, konnte bisher noch nicht eindeutig dargelegt werden. Vielmehr scheint es sich hierbei um ein komplexes Netzwerk mit verschiedensten Interaktionen zu handeln. Beispielsweise wird die, durch Melatonin induzierte Produktion von Zytokinen wie IL-2 und IL-6 in PBMCs abhängig vom Aktivierungsstatus der Zelle entweder über Membran- oder nukleäre Rezeptoren vermittelt [74].



#### 2.4.4 Melatonin in Inflammation und Sepsis

Bereits 1995 erschienen erste Hinweise auf eine mögliche immunprotektive Rolle von Melatonin in der Inflammation [88]. Weitere Ergebnisse beschrieben Melatonin als potentiell Therapeutikum in der Behandlung des septischen Schocks [89]. So konnte in der Vergangenheit anhand verschiedenster Sepsismodelle für Mäuse und Ratten eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit und eine Reduktion von Organschäden nach Melatoninapplikation festgestellt werden [88, 90, 91]. Für diese positiven Effekte werden einerseits das starke antioxidative Potential [88, 92], zum anderen die schon oben erwähnte rezeptorvermittelte Organprotektion verantwortlich gemacht.

Melatonin besitzt zahlreiche antiinflammatorische Effekte. Es steigert die Aktivität von NK-Zellen und die  $T_{H2}$ -Zell-vermittelte Immunantwort [93]. In der akuten Entzündungsreaktion reduziert es durch verschiedenste Interaktionen die induzierte Gewebeerstörung. Nach Aktivierung von Phagozyten durch proinflammatorische Mediatoren bakterieller Produkte kommt es zur massiven Ausschüttung reaktiver Sauerstoffverbindungen wie dem Superoxid-Anionenradikal  $O_2^-$ , Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), dem Hydroxylradikal  $OH$  und  $NO$ . Durch oxidative Degradation von Membranlipiden und Oxidation von Lipiden und DNA entfalten diese freien Radikale ihre toxische Wirkung. Das entstandene Ungleichgewicht zwischen oxidierenden Verbindungen und endogenen Antioxidantien führt schließlich zu einer veränderten Stoffwechsellage mit eingeschränkter Zellfunktion (oxidativer Stress) [94]. Aufgrund seiner starken Wirkung als Antioxidans und Radikalfänger ermöglicht Melatonin eine Reduktion makromolekularer Schäden [95]. Neben seiner Eigenschaft als Elektronendonator kann Melatonin direkt mit Peroxyl-Radikalen [96], Sauerstoff-Spezies [97] und Wasserstoffperoxid interagieren [98]. In experimentellen Studien konnte für Melatonin außerdem die Hemmung der LPS-induzierten NO-Produktion gezeigt werden [99]. Diese Wirkung scheint unabhängig von GPCRs und vielmehr über eine Hemmung der NF $\kappa$ B-Transkription vermittelt zu sein [99]. Weiterhin besitzt Melatonin die Fähigkeit, die Genexpression antioxidativer Enzyme zu aktivieren [100]. Hierbei handelt es sich u. a. um die Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Glutathion-Peroxidase (GSH-Px). SOD baut das hochreaktive Sauerstoffradikal Superoxid zu Wasserstoffperoxid ab. Weiterhin nutzt die GSH-Px das antioxidative Molekül Glutathion, dessen Regeneration und Produktion selbst durch Melatonin

reguliert wird [101], um Wasserstoffperoxid zu eliminieren. Nicht zuletzt besitzen die Abbauprodukte des Melatonins, AFMK und AMK, selbst starke antioxidative Wirkungen, können freie Radikale abfangen und mindern somit oxidativen als auch nitrativen Schaden [102].

Neben ihrer direkten toxischen Wirkung auf Biomoleküle, sind reaktive Sauerstoffspezies auch in der Lage die inflammatorische Antwort durch Stimulation bestimmter Genen zu modulieren. Die Stimulation von Entzündungs-vermittelten Genen erfolgt unter anderem über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Melatonin verhindert die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA und damit die Produktion proinflammatorischer Zytokine [88, 90, 91]. Dadurch können massiv erhöhte mRNA-Konzentrationen von IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  in der Entzündung durch frühzeitige Applikation des Indolamins normalisiert werden [103]. Außerdem scheint Melatonin auch antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TNF $\beta$ , zu beeinflussen [88]. Somit kann die Inflammation reduziert und ein mögliches Multiorganversagen verhindert werden.

Melatonin wirkt über Rezeptoren auf immunkompetenten Zellen als Immunmodulator [104]. In menschlichen Lymphozyten produziertes Melatonin ist über Membran- und nukleäre Rezeptoren in die physiologische Expressionsregulation von IL-2 und des IL-2-Rezeptors involviert [105]. Der Haupteffekt von Melatonin auf Lymphozyten scheint jedoch über den MT1-Rezeptor vermittelt zu sein [106]. Dennoch gibt es zunehmende Evidenz dafür, dass auch der MT2-Rezeptor in die Immunfunktion involviert ist [107].

Endotheliale Dysfunktion mit anschließender Adhäsion zirkulierender Leukozyten stellt einen kritischen Schritt in entzündlichen Prozessen dar. Als Antwort auf proinflammatorische Stimuli reagieren vaskuläre Endothelzellen mit der Expression verschiedenster Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1 (interzelluläres Zell-Adhäsionsmolekül-1), VCAM-1 (vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül-1) sowie verschiedensten Selektinen [108]. Möglicherweise wird der antiinflammatorische Effekt von Melatonin dabei nicht nur durch Hemmung proinflammatorischer Zytokine, sondern vielmehr durch reduzierte Expression dieser Adhäsionsmoleküle vermittelt [103, 109]. Dies führt zu einer reduzierten Leukozyten-Endothel-Adhäsion und

transepithelialen Zellmigration [110] und dadurch zu einer verminderten Rekrutierung von PMNCs zum Ort der Entzündung .

Eine weitere protektive Funktion in der Sepsis kommt Melatonin in der Rolle als anti-apoptotischem Mediator zu. So führt die mitochondriale Überproduktion von ROS über eine prooxidative Rückkopplung zu Apoptose-Signalen. Melatonin scheint diese Wirkung über veränderte Regulation der Bax/Bcl-2 Expression mit einer Hochregulation von Bcl-2 zu verhindern [111]. Dieser Effekt wird über membranständige MT<sub>1</sub>- und MT<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt [111, 112]. Somit mindert Melatonin den Sepsis-induzierten Zelltod in Milzzellen [88].

#### **2.4.5 Melatoninrezeptoren und Signaltransduktion**

Über welche molekularen Wege die pleiotropen Effekte von Melatonin vermittelt werden, ist bisher nicht ausreichend untersucht. Einflüsse von Melatonin auf verschiedene Signalwege, wie die Modulation von PI3K/Akt, die Phosphorylierung verschiedener Kinasen (MEK1/2, ERK1/2, JNK) und der Einfluss auf die Phospholipase C-Aktivität sind jedoch bekannt und im Rahmen der anti-inflammatorischen Wirkung in der Sepsis Bestandteil aktueller Forschungen [113]. Definitive Wirkungen von Melatonin über Membranrezeptoren und nachgeschaltete Signalkaskaden konnten bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. In den letzten Jahren zeigte sich zunehmende Evidenz, dass die physiologischen und pleiotropen Funktionen von Melatonin über eine regulatorische Funktion im MAPK- und PI3/Akt-Signalweg vermittelt werden. So scheint auch die transiente Aktivierung von ERK und der p38 MAPK, in den zirkadianen Mechanismus der Epiphyse involviert zu sein [114, 115] (Abb.3).

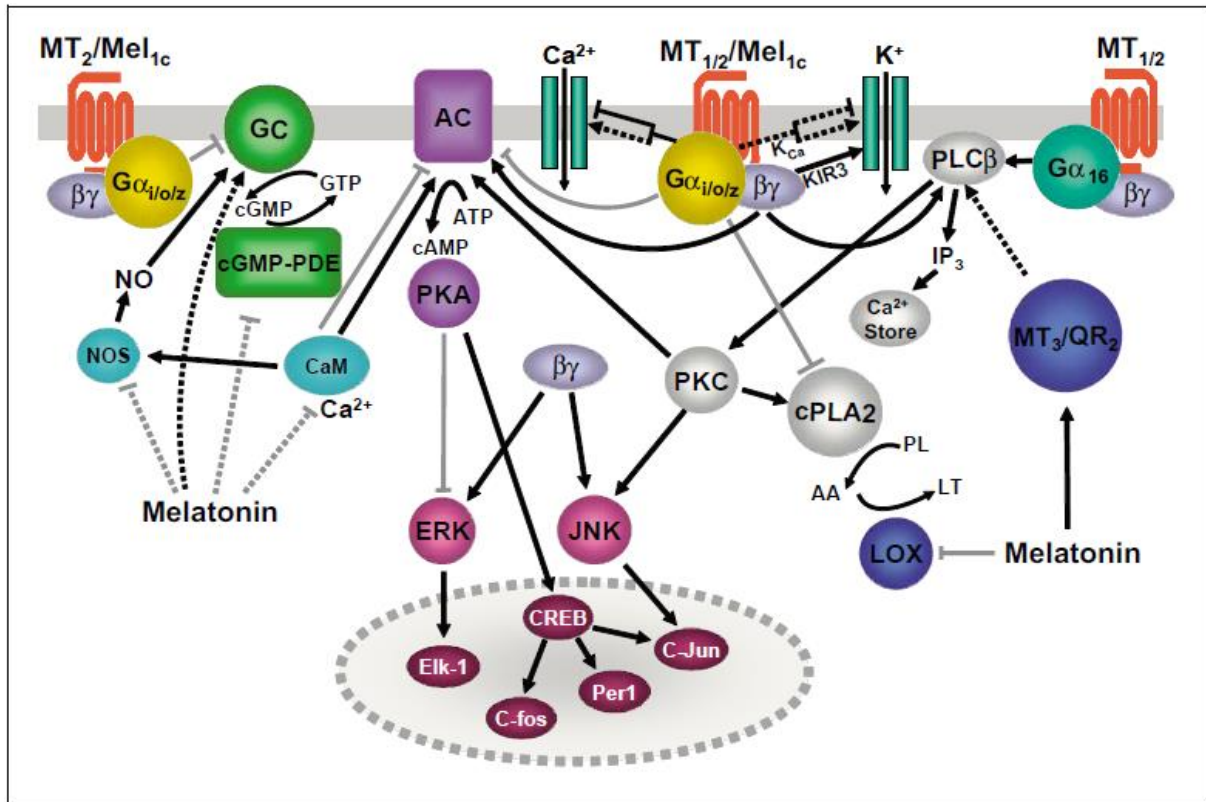


Abb. 3: Melatoninrezeptor-vermittelte intrazelluläre Signalkaskaden, nach New *et al.* [115]

Melatonin-Applikation in UVB-gestressten U937-Leukozyten führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK1/2 und einer verminderten Aktivierung der Stresskinasen p38 MAPK und JNK [29], was sich in einem besserem Überleben äußerte. Den gleichen Effekt zeigte Melatonin auch in nichtstimulierten Zellen auf ERK1/2 und JNK, jedoch nicht auf p38 [29, 116, 117]. In nicht-neuronalen Zellen werden die MT-Rezeptor-induzierten Effekte auf ERK1/2 vermutlich über Rezeptor-Internalisierung und Mikrotubuli-Modulation vermittelt [117].

Weiterhin scheint ein „cross-talk“ zwischen den verschiedenen Kinasen zu bestehen [116]. So führt eine Hemmung der p38 MAPK zu einer gesteigerten ERK-Phosphorylierung. Jedoch scheint ERK1/2 in der Hierarchie über JNK und p38 zu stehen und für die Rezeptor-vermittelte Melatonin-Wirkung verantwortlich zu sein. [118]. Nach diesem Modell wirken p38 und JNK als Checkpoint für die Initiation der Apoptose bzw. der Inflammation und können durch direkten Einfluss von Melatonin auf den ERK MAPK-Weg gehemmt werden. Außerdem wird vermutet, dass zwischen ERK1/2 und MT<sub>1</sub>-Rezeptoren ein ERK-abhängiger negativer Feedbackmechanismus besteht, welcher zu einer Herunterregulation der Rezeptorexpression führt [119].

Diese Ergebnisse weisen auf eine regulatorische Schlüsselrolle von Melatonin in der Stressantwort humaner Leukozyten hin.

Antiproliferative Effekte durch Melatonin werden mit einer drastischen Hemmung der ERK MAPK und PI3/Akt-Signalwege in Verbindung gebracht [120, 121]. Außerdem ist Melatonin in der Lage, die LPS-induzierte Akt-Phosphorylierung zu hemmen, was seine wichtige antiinflammatorische Wirkung unterstreicht [122]. Erst kürzlich konnte durch Melatonin-vermittelte Reduktion der JNK-Phosphorylierung eine Verringerung des apoptotischen Leberschadens in einem Modell des fulminanten Leberversagens nachgewiesen werden [123]. Andere Ergebnisse deuten jedoch auf eine protektive Wirkung von Melatonin durch Aktivierung des PI3/Akt-Signalwegs hin [116]. Ein Anstieg der JNK- und p38-Expression, vermittelt über den MT<sub>1</sub>-Rezeptor Signalweg, konnte in HepG2 Leberkarzinomzellen nachgewiesen werden, welcher mit der Fähigkeit von Melatonin, Apoptose und Zellzyklusarrest in Krebszellen zu induzieren, in Zusammenhang steht [124]. Weitere Ergebnisse deuten auf eine gleichzeitig gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 [125] und JNK [116] in unstimulierten Zellen hin. Diese scheint durch die beiden membranständigen Melatoninrezeptoren vermittelt zu sein.

Diese sich scheinbar widersprechenden Effekte lassen sich möglicherweise auch über unterschiedliche Rezeptor-vermittelte biologische Aktionen des MT<sub>1</sub>- und MT<sub>2</sub>-Rezeptors erklären. Beispielsweise ist die Aktivität von ERK in murinen Neuroblastom-Zellen, welche ausschließlich MT<sub>1</sub> exprimieren, gesteigert [126], während in Zellen, welche beide Rezeptoren aufweisen, ERK durch Melatonin gehemmt wird [127]. Darüber hinaus senkt Melatonin p38 in WT- und MT<sub>1</sub><sup>-/-</sup>/MT<sub>2</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen nach fokaler zerebraler Ischämie, JNK jedoch nur in WT-Tieren [128].

Trotz zunehmender Forschungsansätze zum Einfluss der MT-Rezeptoraktivierung auf intrazelluläre Signalwege, ist über die molekularen Mechanismen der Organprotektion und der veränderten Immunfunktion bisher nur wenig bekannt. Jedoch scheinen erste Ergebnisse, gerade im Bereich der Sepsis-assoziierten Immunreaktion, als sehr vielversprechend. Um einen zukünftigen Einsatz von Melatonin in der Intensivmedizin zu ermöglichen, sind allerdings weiterführende Untersuchungen notwendig, insbesondere im Hinblick auf Melatonin-vermittelte intrazelluläre Effekte.

## 2.5 Ziele der Arbeit

Eine Aktivierung von Melatoninrezeptoren führt zu einer Verlängerung des Überlebens nach polymikrobieller Sepsis bei der Maus. Die genauen Mechanismen, die dieser Protektion zugrunde liegen, sind bisher noch weitgehend unbekannt. Gerade für die immunmodulatorische Wirkung von Melatonin ist die Datenlage widersprüchlich. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer Melatonintherapie sowie die Aktivierung der membranständigen Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 auf die intrazellulären Signalwege und die Genexpression inflammatorischer Mediatoren nach polymikrobieller Sepsis in Milzzellen von Mäusen zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen sollten überprüft werden:

- 1) Gibt es Unterschiede im Genexpressionsniveau zwischen WT- und ( $MT_1^{-/-}$  /  $MT_2^{-/-}$ )-Mäusen?
- 2) Welchen Einfluss hat die Melatoninrezeptoraktivierung auf intrazelluläre Signalwege?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller / Vertrieb
Analysenwaage ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Albstadt
CFX 96 Real-Time PCR Detection Systems	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
CO2 Inkubationsschrank Typ B5060 EK	Heraeus Holding GmbH, Berlin
Druckabnehmer BD DTXPlus™	BD Diagnostics, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Olympus CH 30, AF 200	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Durchlichtmikroskop Wilovert A	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Easia Shaker	Medgenix Diagnostic, Biosource GmbH, Ratingen
Elektrophorese Stromquelle E452 / E865	Consort nv, Turnhout, Belgien
Elektrophoresekammern	Novex Elektrophoresis GmbH, Frankfurt
Elisa Microplate Reader EL800	BioTek, Bad Friedrichshall
Geldokumentationssystem Felix 2020	biostep GmbH, Jahnsdorf
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer Corporate Headquarters, Massachusetts, USA
Hb-Messgerät Hemocue® B-Hemoglobin Photometer	Hemocue AB, Ängelholm, Schweden
Heizmatte Terra-Exotica Comfort	Terra-Exotica, Alfeld, Deutschland
Homogenisator Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik, Staufen IKA
Inversionsmikroskop Axiovert 135, Model C4742-96-12G04	Carl Zeiss AG, Jena
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD 150 Watt	Schott AG, Mainz
Kamera Polaroid DS 34 Direct screen instant camera	Polaroid Corporation, Massachusetts, USA
Kühlzentrifuge Z 233 MK-2	HERMLE Labortechnik GmbH,

	Wehingen
Laborinkubator Incucell 55 Standard	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, München
Magnetrührer Ikamag RET-GS	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrfachdispenser Handy Step®	Brand GmbH, Wertheim
MicroChemi Chemiluminescence Imaging System 4.2	DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel
Mikrowellenherd	Panasonic, Hamburg
Monitor Hewlett Packard M1166A, Model 66S	Hewlett-Packard Company, Kalifornien, USA
Nanophotometer® P330	Implen GmbH, München
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PerfectBlue Tank-Elektroblotter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PerfectBlue Vertikale Doppelgelsysteme	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Perfusor Secura FT	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
pH-Meter, pH 523	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Schweden
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet	Brand GmbH, Wertheim
Quarzküvette	Pharmacia Biotech, Schweden
Sterile Werkbank, ANTARES 48/72	Heraeus Holding GmbH, Berlin
Sterile Werkbank, Labcaire Model 3650	PuriCore's Labcaire Laboratory Business, Levedon, England
Stromquelle Power Supplies EV200 Serie	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tischzentrifuge ProFuge 10K	Stratagene, Kalifornien, USA
TissueLyser LT	QIAGEN GmbH, Hilden
Transilluminator TFX-20M 6 x 15 W, 312nm Tube	RS Rothhaar&Schroeder Laborgerätehandel, Heidelberg
Universal Thermostat	Conrad Electronic SE, Hirschau
UV-Transilluminator	biostep GmbH, Jahnsdorf
Vortexer L46	GLW mbH, Würzburg



Vortexer Labnet VX100	MO BIO Laboratories, Kalifornien, USA
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage Kern 470	Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Wasserbad Typ 1002	GFL mbH, Hannover
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Berlin

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikartikel, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Sarstedt, Nürnberg, bezogen.

Artikel	Hersteller / Vertrieb
6-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-Well-PCR-Platte, 0,2 ml	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
B-Hemoglobin Mikroküvetten	HemoCue AB, Ängelholm, Schweden
Blut-Agar Merckoplate®	Merck KGAA, Darmstadt
Cell Strainer 100µm	BD Diagnostics, Heidelberg
Combi-Stopper	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalspritze, 1 ml, Plastipak TM	BD Diagnostics, Heidelberg
Einmalspritze, Injekt®	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Faltenfilter	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Filterpapier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Gefäßkatheter: Fine-Bore Polythene Tubing, ID 0,28 mm, OD 0,61 mm	Smiths Medical, New Hampshire, USA
Kanüle BD MicrolanceTM 3	BD Diagnostics, Heidelberg
Mikro-Hämatokrit-Kapillare, heparinisiert	Brand GmbH, Wertheim
Nahtmaterial PremiCron®	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Obergarn NE 50/3 100% Baumwolle	Fa. Globus, Homburg-Einöd
Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PCR-Abdeckfolie	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
PVDF Western Blotting Membranes	Roche Diagnostics Deutschland GmbH,

	Mannheim
Rollenpflaster Leukoplast	BSN medical, Hamburg
Saran Verpackungsfolie	Dow Chemical Company, Schwalbach am Taunus
Sofortfilme Fujifilm FP 3000 B sw, ISO 3000, 8,5 x 10,8 cm	Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan
Trachealkanüle: Venenverweilkatheter, Venflon TM Pro Safety 20 G	BD Diagnostics, Heidelberg

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht gesondert aufgeführt, wurden alle Chemikalien von der Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, bezogen.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller / Vertrieb
10x Reaktionspuffer mit MgCl <sub>2</sub> für DNase	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
5x Hot Start Taq EvaGreen® qPCR Mix	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
5x Reaktionspuffer für RT	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Akt (pan) Rabbit mAb #4691	Cell Signaling Technology, USA
Anti-rabbit IgG Sekundär-AK #7074	Cell Signaling Technology, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Carbostesin 0,5 % Injektionslösung	AstraZeneca, Wedel
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, USA
DEPC (Diethyldicarbonat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNase I, RNase-frei, 1U/ul	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
dNTP Mix, 10mM of each	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
ECL <sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
EDTA 50mM	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Ethidiumbromid	Axon Labortechnik, Kaiserslautern

FastTri RNA Extraction Reagent	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Fetales Kälberserum Standard	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formamide Redestilled UltraPure	GiscoBRL Life Tech., Paisley, UK
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Isotone Kochsalzlösung NaCl 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Loading Dye Solution 6x	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter GmbH, Ober Günzburg
Melatonin	Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg Saar
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Oligo(dT)18 Primer, 0,5 ug/ul	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
OptEIA™ Assay Diluent	BD Diagnostics, Heidelberg
OptEIA™ Rat TNF ELISA Set	BD Diagnostics, Heidelberg
OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set	BD Diagnostics, Heidelberg
p38 MAPK XP® Rabbit mAb #8690	Cell Signaling Technology, USA
p44/42 MAPK Rabbit mAb #4695	Cell Signaling Technology, USA
Pentobarbital-Natrium „Narcoren“	Merial GmbH, Hallbergmoos
PeqGold TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGold Universal-Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phenylmethanesulfonyl fluoride, ≥98.5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phospho-Akt XP® Rabbit mAb #4060	Cell Signaling Technology, USA
Phospho-p38 MAPK XP® Rabbit mAb #4511	Cell Signaling Technology, USA
Phospho-p44/42 MAPK XP® Rabbit mAb #4370	Cell Signaling Technology, USA
Phospho-SAPK/JNK Rabbit mAb #4668	Cell Signaling Technology, USA
Primer, salzfreie Oligos, lyophilisiert, 100uM	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
RevertAid Reverse Transkriptase	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot

200U/ul	
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
SAPK/JNK Ab #9252	Cell Signaling Technology, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck KGAA, Darmstadt
Sevofluran Baxter	Baxter GmbH, Unterschleißheim
SlimFast Milchshake Pulver	Allpharm Vertriebs GmbH, Messel
Sterofundin ISO	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 3.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Stammlösungen und ebenso alle daraus hergestellten Lösungen wurden mit *bidest.* H<sub>2</sub>O angesetzt. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren.

#### **Bromphenolblau-Lösung:**

10x MOPS Pufferan® (ohne EDTA)	0,94 ml
H <sub>2</sub> O-DEPC	2,27 ml
Sucrose	4 g
Bromphenolblau	50 mg

#### **Carbonat- / Bicarbonat-Puffer (0,1 M) pH 9,5:**

NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3,56 g
H <sub>2</sub> O	1 l

#### **Coomassie blau Färbelösung:**

Brillant Blau R250	1,25 g
Methanol 100 %	227 ml
Essigsäure	46 ml
H <sub>2</sub> O	227 ml

**DNA-Elektrophoresegel 2 %:**

Agarose	2 g
1x TAE-Puffer	100 ml
Ethidiumbromid-Lösung	1 µl / 100 ml

**EDTA (250 mM):**

EDTA	4,7 g
H <sub>2</sub> O	50 ml

**Erythrozyten-Lysepuffer, 0,83%, pH 7,4:**

Ammoniumchlorid NH <sub>4</sub> Cl 0,83%	830 mg
Tris-Puffer 0,01M	100 ml

**Ethidiumbromid-Lösung:**

H <sub>2</sub> O-DEPC	1 ml
Ethidiumbromid	10 mg

**Laufpuffer Elektrophorese:**

1x MOPS-Puffer	80 ml
H <sub>2</sub> O	720 ml

**10 x LLP-Elektrophoresepuffer:**

SDS	10 g
Tris base	29 g
Glycin	144 g
H <sub>2</sub> O	1 l

**Lösung A, pH 8,9 (separating gel buffer):**

Tris HCl	2,88 g
Tris base	15,96 g
SDS	0,4 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

**Lösung B (stacking gel buffer):**

Tris base	6,057 g
H <sub>2</sub> O	100 ml
SDS	0,4 g
Bromphenolblau	wenige Körnchen

**Lyse-Puffer (Western Blot):**

Tris pH 7,5, 1M	2 ml
NaCl, 5M	0,4 ml
EDTA 250mM	80 µl
Triton X 100, 10%	10 ml
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) 4%	1 ml
unmittelbar vor Gebrauch 20µl 100mM PMSF-Lösung / ml Puffer hinzugeben	

**1x MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure-Puffer), pH 7,0:**

MOPS Pufferan®	104,7 g
EDTA	3,7 g
mit NaOH 10 M auf pH 7,0 einstellen	

**10 x PBS (phosphate buffered saline), pH 7,4:**

Kochsalz (NaCl)	80 g
Kaliumchlorid (KCl)	2 g
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2H <sub>2</sub> O)	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2,4 g
H <sub>2</sub> O	1 l

**PMSF-Lösung (100mM)**

PMSF	174,2 mg
Isopropanol 100 %	10 ml

**2x Probenpuffer (Lämmli-puffer):**

Tris 0,5 M, pH 6,8	2,5 ml
Glycerin 20%	2 ml
SDS 20 %	2 ml
Bromphenolblau	20 mg
H <sub>2</sub> O	3,5 ml
Mercaptoethanol	10 µl / ml

**RNase-freies Wasser (H<sub>2</sub>O-DEPC):**

H <sub>2</sub> O	1l
DEPC-Lösung	1ml

**RNA-Elektrophoresegel 1,2 %:**

Agarose	10 g
H <sub>2</sub> O	86 ml
10x MOPS-Puffer	12 ml
Formaldehyd 37 % p.a.	22 ml

**RNA-Probenpuffer:**

10x MOPS-Puffer ohne EDTA	30 µl
1x MOPS-Puffer mit EDTA	30 µl
Formamid	150 µl
Formaldehyd 37% p.a.	54 µl
Bromphenolblau-Lösung	10 µl
Ethidiumbromid-Lösung	1 µl

**4 % SlimFast:**

SlimFast	4 g
1 x TTBS	100 ml

**Stacking Gel, Western Blot (5 %):**

Lösung B	2,5 ml
Rotiporese Gel 30	1,33 ml

H <sub>2</sub> O	6,17 ml
APS 10 %	100 µl
Temed	10 µl

**50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA), pH 8,3:**

TRIS Pufferan® 121,14 g / mol	121 g
Essigsäure (99%)	22 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	50 ml
H <sub>2</sub> O	500 ml

**10 x TBS-Puffer:**

Tris HCl	25,4 g
Tris base	4,72 g
NaCl	292,2 g
H <sub>2</sub> O	1 l

**10 x Transferpuffer:**

Tris base	30,3 g
Glycin	144,1 g
H <sub>2</sub> O	1 l

**1 x Transferpuffer:**

10 x Transferpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	700 ml

**Trenngel, Western Blot (12%):**

Lösung A	7,5 ml
Rotiphorese Gel 30	9,6 ml
H <sub>2</sub> O	12,9 ml
APS 10 %	300 µl
Temed	30 µl



**1M Tris-Puffer (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer), pH: 7,5**

Tris HCl	6,35 g
Tris base	1,18 g
H <sub>2</sub> O	50 ml

**5 % Trockenmilch:**

Trockenmilch	5 g
1 x TTBS	100 ml

**1x TTBS-Puffer:**

10 x TBS-Puffer	100 ml
Tween®20	1 ml
H <sub>2</sub> O	900 ml

**Waschpuffer für ELISA:**

1x PBS-Puffer	1 l
Tween® 20	500 µl

**Zellkulturmedien:****- Komplett-Medium:**

RPMI 1640 mit Glutamin	450 ml
10% Fetales Kälberserum (FBS)	50 ml
(30 Min. Hitze-deaktiviert bei 65°C)	

**- Waschmedium:**

RPMI 1640 mit Glutamin	
------------------------	--

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Tierexperimentelle Methoden**

#### **3.2.1.1 Versuchstiere**

Entsprechend § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes wurden alle Versuche nach Genehmigung durch die zuständige Landesbehörde (Landesamt f. Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz, Saarbrücken) im Forschungslabor der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der Universität des Saarlandes durchgeführt (Nr. 04/2012). Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um weibliche geschlechtsreife C3H/HeN Wildtyp-Mäuse (WT) und Melatoninrezeptor-Doppelknockout ( $MT1^{-/-}/MT2^{-/-}$ )-Mäuse (KO), im Alter von 12-22 Wochen. Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere lag bei 25 g.

Die Tiere wurden in Makrolon® - Käfigen Typ III in Gruppen von bis zu fünf Tieren gehalten. In den klimatisierten Räumen der Versuchstierhaltung herrschte eine Temperatur von 20 °C – 23 °C, sowie eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-55%. Wasser aus Trinkflaschen und pelletierte Nager-Standarddiät (Haltungsfutter, Fa. Ssniff, Soest, Deutschland) standen bis unmittelbar vor Versuchsbeginn *ad libitum* zur Verfügung. Durch ein automatisches Beleuchtungsprogramm wurden die Tiere in den fensterlosen Räumen Hell-Dunkel-Phasen von jeweils 12 Stunden ausgesetzt. Die Doppelknockout-Mäuse entsprangen der eigenen Zucht, während die Wildtyp-Tiere von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Um eine Akklimatisierung an die vorgegebenen Bedingungen zu gewährleisten, wurden die gekauften Tiere frühestens drei Tage nach Ankunft in die Versuche aufgenommen.

### 3.2.1.2 Versuchsgruppen

Die Einteilung der Versuchstiere erfolgte in vier Gruppen, wobei die Operation (Sham oder Sepsis) randomisiert wurde (Tab.2).

Tab. 2: Einteilung in Versuchsgruppen

Gruppe	Genotyp	Operation	Anzahl
1	Wildtyp	Sham	n = 5
2	Wildtyp	Sepsis	n = 5
3	MT1 <sup>-/-</sup> /MT2 <sup>-/-</sup>	Sham	n = 5
4	MT1 <sup>-/-</sup> /MT2 <sup>-/-</sup>	Sepsis	n = 5
		<b>Gesamt</b>	<b>n = 20</b>

### 3.2.1.3 Versuchsprotokoll

Am Morgen des Versuchstages wurden mithilfe eines vaginalen Abstriches die Tiere ausgewählt, welche sich im Metöstrus, d.h. in der Zyklusphase mit konstant niedrigen Plasmaspiegeln von Sexualhormonen, befanden. Die Operation begann, für alle Tiere einheitlich, zwischen 8 und 9 Uhr.

Entsprechend der randomisierten Versuchsgruppe erfolgte die Operation mittels Coecumligatur und Inzision (Sepsis) oder lediglich die kurzfristige Auslagerung des Coecums (Sham). Nach Anlage eines zentralen Venenkatheters (ZVK) und eines arteriellen Zugangs erfolgte über die gesamte Länge des Beobachtungszeitraums die Überwachung und Erfassung der Vitalparameter. Neben der kontinuierlichen Volumensubstitution mittels einer Spritzenpumpe wurde auf eine ausreichende Narkosetiefe durch *i.v.* Bolusgaben von Pentobarbital geachtet.

Sowohl nach der Standardoperation (Zeitpunkt 1), als auch unmittelbar vor dem Ende des Beobachtungszeitraums (Zeitraum 2) wurden jeweils ca. 10 – 15 µl Blut zur Bestimmung der Leukozytenzahl entnommen (Abb.4).

Da es sich bei der Studie um einen Finalversuch handelte, wurden die Tiere 60 Minuten nach Beginn des Beobachtungszeitraums schmerzlos in tiefer Narkose durch vollständige Blutentnahme und gleichzeitiger *i.v.* Injektion einer Überdosis Pentobarbital getötet.

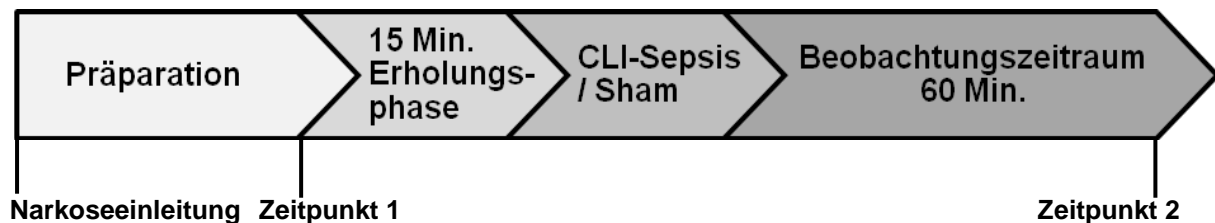
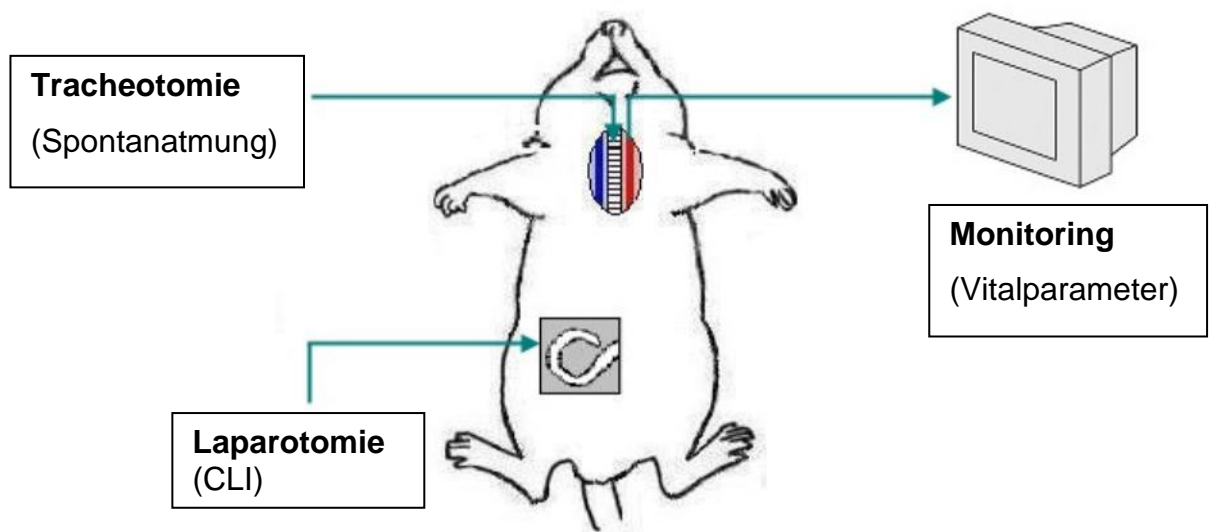


Abb. 4: Zeitlicher Ablauf der Tierversuche

### 3.2.1.4 Zyklusbestimmung der Maus

#### 3.2.1.4.1 Probengewinnung

Da Sexualhormone bekanntermaßen einen Einfluss auf bestimmte Immunfunktionen ausüben [129, 130], ist es bei Studien mit weiblichen Mäusen von besonderer Bedeutung, deren Zyklusstadium exakt zu bestimmen. Um den Einfluss möglichst gering zu halten wurden in dieser Studie ausschließlich Tiere im Metöstrus ausgewählt, in welchem konstant niedrige Plasmaspiegel von Östrogen, Progesteron und Prolaktin vorherrschen und keine gesteigerte Immunprotektion beschrieben ist [129-131].

Zur besseren Kontrolle wurde das Zyklusstadium der Tiere jeweils mehrere Tage vor Versuchsbeginn überprüft. In Anlehnung an Caligioni *et al.* [132] wurden die Tiere hierfür in Rückenlage fixiert und eine weiche Plastikpipette 2-3 mm in die Vagina eingeführt. Durch vorsichtige Spülung mit 15 µl steriler isotoner Kochsalzlösung

konnte Zellmaterial vom Scheidenboden und -dach gewonnen und anschließend auf einem Objektträger ausgestrichen werden.

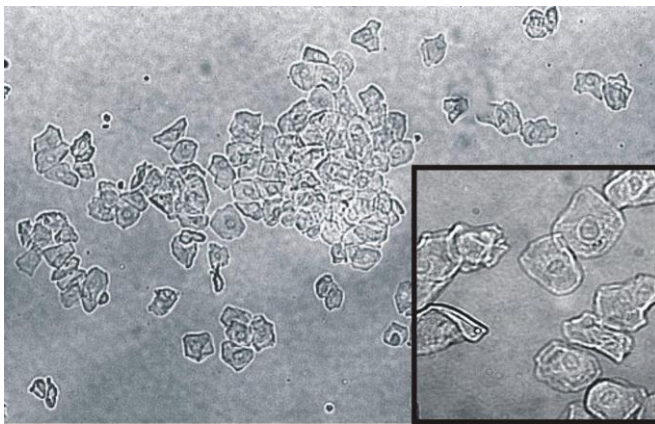
#### **3.2.1.4.2 Auswertung des Abstriches**

Der Nativ-Ausstrich wurde bei 10-facher Vergrößerung im Durchlicht ausgewertet. Abhängig vom Zyklusstadium konnten vier charakteristische Zytologien unterschieden werden, welche sich durch das Auftreten typischer Zellen im Ausstrich kennzeichnen [133].

#### Proöstrus

Der Proöstrus umfasst einen Zeitraum von 12 – 24 Stunden [134]. Dabei erreicht das vaginale Epithel seine stärkste Dicke. Im Abstrich findet sich eine mäßige Anzahl kernhaltiger Epithelzellen, welche sich in Zellhaufen darstellen können. Gelegentlich können auch verhornte Epithelzellen auftreten. Leukozyten und Schleim sind nicht vorhanden (Abb.5).

In dieser Phase kommt es zum raschen Anstieg von Östradiol [135], mit nachfolgendem LH- und FSH-Peak in der Nacht, welche zur Ovulation führen.



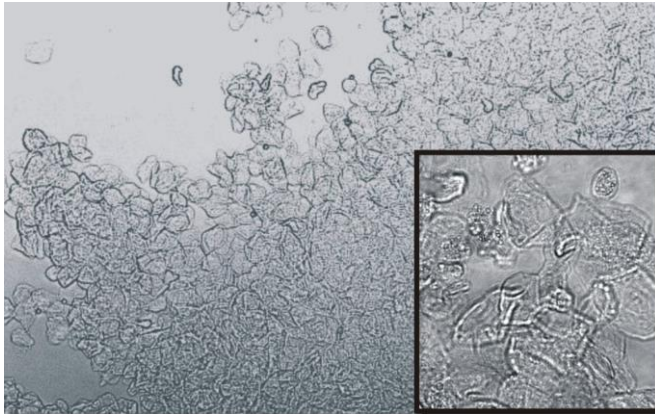
**Abb. 5: Vaginalabstrich der Maus im Proöstrus 10x (40x)**

#### Östrus

Dieses Stadium ist durch kernlose, verhornte Plattenepithelzellen charakterisiert, welche sich in Clustern anordnen (Abb.6). Die Zellen erscheinen unförmig und das Zytoplasma granulär. Grund hierfür ist eine beginnende Autolyse und kontinuierliche Verhornung der Zellen. Auch hier sind keine Leukozyten vorhanden. Bis zum

Nachmittag bleiben die Östradiolspiegel weiterhin erhöht, um anschließend wieder auf Basalwerte zu sinken [135].

Vianney bezifferte die Länge des Östrus auf 36 Stunden [134], Morrow auf 10 – 20 Stunden [136].

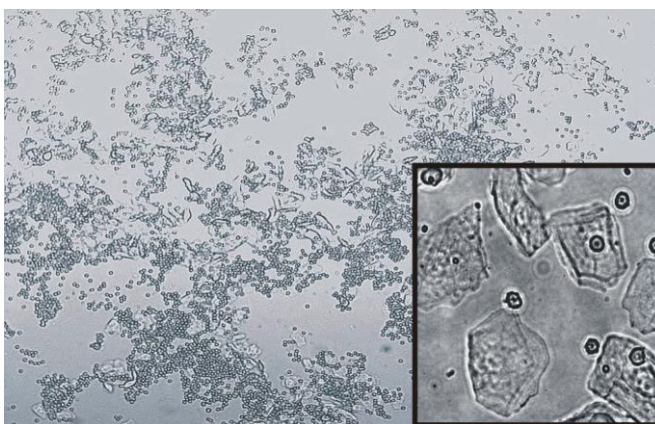


**Abb. 6: Vaginalabstrich der Maus im Östrus 10x (40x)**

### Metöstrus

In dieser Zyklusphase findet sich eine Mischung aus Zellen. Den Großteil stellen die Leukozyten dar, welche in das vaginale Lumen einwandern und abgestoßene Zellen abbauen. Somit finden sich auch kernhaltige Epithelzellen und / oder verhornte Plattenepithelzellen im Ausstrich (Abb.7). Die Östradiol-Konzentration im Plasma befindet sich auf ihrem basalen Level [135].

Die Länge des Metöstrus wird mit 24 – 48 Stunden angegeben [136].



**Abb. 7: Vaginalabstrich der Maus im Metöstrus 10x (40x)**

### Diöstrus

Nach Abbau des Epithels auf drei bis sieben Zellschichten erscheint das typische Aussehen des Diöstrus. In diesem Stadium finden sich überwiegend Leukozyten, aber auch wenige kleine degenerierte epitheliale Zellen im Vaginalabstrich [137] (Abb.8). Auch hier ist die Estradiol-Konzentration niedrig [135].

Laut Vianney dauert der Diöstrus bis zu 48 Stunden [134].

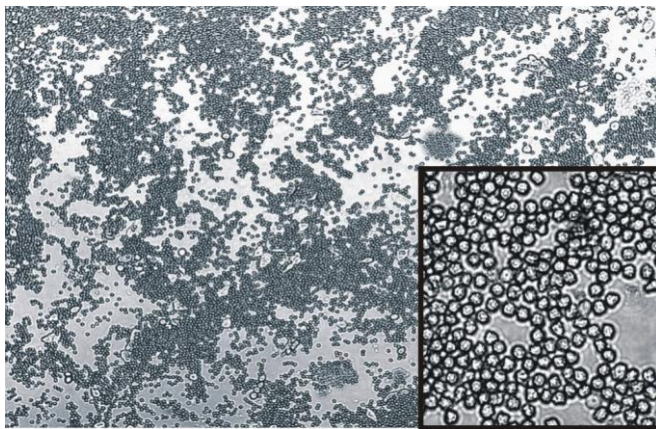


Abb. 8: Vaginalabstrich der Maus im Diöstrus 10x (40x)

#### **3.2.1.5 Narkose**

Zu Beginn der operativen Vorbereitung wurde das Versuchstier gewogen. Mittels einer inhalativen Kurznarkose mit Sevofluran wurden die Tiere sediert. Nach Beruhigung der Atmung erfolgte die intraperitoneale Injektion einer Pentobarbital-Lösung (Pentobarbital-Natrium "Narcoren", 16 g / 100 ml, Merial GmbH, Hallbergmoos). Diese wurde hierfür im Verhältnis 1:3 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und von dieser Verdünnung 10 ml/kg KG (entspricht ca. 50 mg/kg KG) in den linken unteren abdominellen Quadranten injiziert. Zur Einschätzung der Narkosetiefe wurde das Bewusstsein überprüft, sowie die Reaktion auf Schmerzreize getestet.

In tiefer Narkose, jedoch bei erhaltener Spontanatmung, wurden die Tiere gewogen und auf eine vorgeheizte Aluminiumplatte verlegt. Bei leicht rekliniertem Kopf erfolgte die Fixation mithilfe von Pflasterstreifen in Rückenlage an Kopf, Schwanz und Extremitäten.

Um einer Hypo- bzw. Hyperthermie vorzubeugen, erfolgte während des gesamten Versuchs eine kontinuierliche rektale Kontrolle der Körperkerntemperatur. Diese

wurde durch eine Lichtquelle von oben, sowie mittels Feedback-Regulation einer unter der Aluminiumplatte angebrachten elektrischen Heizmatte konstant auf  $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  gehalten.

### 3.2.1.6 Chirurgisches Vorgehen

Alle chirurgischen Arbeiten erfolgten unter semisterilen Bedingungen. Um Infektionen mit exogenen Erregern zu vermeiden, wurden Geräte, chirurgisches Besteck und Arbeitsflächen sorgfältig gereinigt und mit 70% Ethanol desinfiziert.

Die Präparation begann mit einem ca. 1,5 – 2 cm langen Hautschnitt in der Medianlinie zwischen *Mandibula* und *Manubrium sterni*. Durch stumpfe Präparation und Mobilisation der *Glandulae submandibulares* sowie der prätrachealen Halsmuskulatur konnte die Trachea dargestellt und mittels einer Inzision zwischen den Knorpelspangen eröffnet werden. Zur Sicherung der Atemwege und um eine ausreichende Spontanatmung der Tiere zu gewährleisten, erfolgte die Platzierung eines Tracheostomas, bestehend aus einem etwa 2 cm langen Polyurethankatheter einer abgeschnittenen Venenverweilkanüle (BD Venflon™ Pro Safety) der Größe 20 G. Der Katheter wurde unter Kontrolle der beidseitigen Lungenatmung ca. 1 cm in der Trachea platziert und fixiert.

Nach vollständiger Freipräparation der rechten *V. jugularis interna* wurde diese kranial ligiert, mittels Mikropinzette und Federschere tangential eröffnet und ein mit Kochsalz vorgefüllter Kunststoffkatheter (ID: 0,28 mm, OD: 0,61 mm) eingelegt, der ebenfalls kranial und kaudal fixiert wurde. Zur Kompensation des perioperativen Blutverlustes erfolgte eine kontinuierliche Volumensubstitution durch Anschluss an ein Perfusorsystem. Damit wurde dem Tier während des gesamten Versuchs Sterofundin ISO in einer Dosierung von 10 ml / kg KG / h über den ZVK zugeführt. Auch die bedarfsgerechte Applikation von Pentobarbital durch intravenöse Bolusgaben von 10 mg / kg KG zur Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte über dieses System.

Im nächsten Schritt wurde die linke *A. carotis communis* in der tiefen paratrachealen Halsmuskulatur durch stumpfe Präparation dargestellt. Durch Eröffnung der *Vagina carotica* wurde der *Nervus vagus* vorsichtig von der Arterie getrennt. Auch diese wurde schließlich kranial ligiert und nach Setzen einer mikrochirurgischen Gefäßklemme eröffnet. Ein mit Kochsalz gefüllter und mit einem Dreiwegehahn



verschlossener Polyethylenkatheter wurde eingeführt und fixiert. Über ein Druckwandler-System wurde dieser Katheter mit dem Überwachungsmonitor verbunden und die Vitalparameter registriert.

Um bei allen Tieren eine einheitliche Narkosetiefe zu erreichen und zur Erholung von der Standardpräparation erfolgte vor dem abdominalen Eingriff eine 15-minütige Unterbrechung der Präparation.

Das Abdomen wurde entlang der *Linea alba* über eine mediane Laparotomie ca. 1,5 cm eröffnet und das Coecum vorsichtig ausgelagert. Sepsis-Tieren wurde das Coecum unter Erhalt der Durchgängigkeit der Darmpassage aboral der Ileocoecalclappe mittels eines Baumwollfadens doppelt ligiert, über einen ca. 1 cm langen Schnitt eröffnet und der Darm in das Abdomen zurückverlagert. Das Coecum der Sham-Tiergruppe wurde nach kurzer Auslagerung von etwa einer Minute ohne Eingriff in die Bauchhöhle reponiert. *Peritoneum parietale* und Fell wurden schichtweise mit jeweils 3-4 Einzelknopfnähten readaptiert und verschlossen.

### **3.2.1.7 Beobachtungszeitraum**

Der Beobachtungszeitraum begann mit dem kompletten Verschluss des Peritoneums und endete 60 Minuten später durch den Tod des Tieres, induziert durch vollständige Blutentnahme und gleichzeitiger *i.v.* Injektion einer Überdosis Pentobarbital.

Alle 15 Minuten wurden Herzfrequenz, MAP und rektale Körpertemperatur dokumentiert. Die Veränderung der Gesamt-Leukozytenzahl in der ersten Stunde nach Sepsis-Induktion wurde anhand von Blutabnahmen über den arteriellen Katheter zum Zeitpunkt 1 und 2 verfolgt (s. Abb. 2). Die zweite Blutentnahme, welche unmittelbar vor Tötung des Tieres erfolgte, diente neben der Leukozytenzählung auch der Anlage einer Bakterienkultur. Hierfür wurde eine komplette Kapillare arterielles Blut entnommen (75 µl).

Unmittelbar nach Todeseintritt erfolgte die Eröffnung der Peritonealhöhle durch einen medianen Bauchschnitt. Im Flankenbereich wurden 100 µl Aszites zur Anlage einer Bakterienkultur entnommen. Anschließend erfolgte die vorsichtige Entnahme der Milz. Der Großteil der Milz wurde in RPMI aufgenommen und hieraus eine Primärkultur der Splenozyten angelegt. Der restliche Teil wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C zur späteren molekularbiologischen Analyse gelagert.

### 3.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden an der Sterilbank durchgeführt.

#### 3.2.2.1 Leukozytenzählung

Zur Durchführung einer selektiven Leukozyten-Analyse müssen Erythrozyten aus dem Vollblut entfernt werden. Hierfür ist eine Lyse der roten Blutkörperchen bis zum Débris-Stadium ohne gleichzeitige Toxizität für die Leukozyten erforderlich. Als wirkungsvollste Lyse, die in Abwesenheit eines Fixiermittels durchgeführt werden kann, gilt die Lyse mit Ammoniumchlorid. Durch den Durchtritt von  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$  durch die Erythrozyten-Membran und spontane bzw. Carboanhydrase-gekoppelte Umwandlung in  $\text{NH}_4^+$  bzw.  $\text{HCO}_3^-$  entsteht  $\text{NH}_5\text{CO}_3$  ( $\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{NH}_5\text{CO}_3$ ), welches eine Alkalisierung des inneren Milieus der Erythrozyten bewirkt. In der Folge kommt es zu einer gesteigerten Durchlässigkeit der Zellmembran und zu einem Anstieg des osmotischen Druckes. Dies bewirkt ein Platzen der Zellmembranen.

Unmittelbar nach Narkoseeinleitung und zum Ende des Beobachtungszeitraums erfolgte mithilfe einer heparinisierten Kapillare die Entnahme von 10  $\mu\text{l}$  Blut über den arteriellen Schenkel des Katheters. 2  $\mu\text{l}$  des entnommenen Vollblutes wurden mit 38  $\mu\text{l}$  Ammoniumchlorid (Verhältnis 1:20) gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur zur vollständigen Hämolyse der Erythrozyten erfolgte die Auszählung der Leukozyten in der Neubauer-Zählkammer bei 10-facher Vergrößerung im Phasenkontrast 1.

#### 3.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Zählnetz einer Neubauer-Zählkammer mit Kleinstquadraten der Dimension  $0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$  verwendet. Nach kurzer Zeit des Sedimentierens erfolgte bei einer Kammertiefe von 0,1 mm die Auszählung der Leukozyten. Dabei wurden vier große Eckquadrate mit einer Fläche von  $4 \text{ mm}^2$  auf beiden Kammerseiten mäanderförmig ausgezählt und die Zellen addiert. Anhand folgender Formel konnte schließlich die Zellzahl bestimmt werden:

$$\text{Summe der 4 Quadrate} \times 50 = x \text{ Zellen} / \mu\text{l}$$

### 3.2.2.3 Splenozyten-Isolation

Die Splenozyten-Isolation erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Coligan *et al.* [138]. Nach möglichst steriler Entnahme der Milz wurde diese in einer Petrischale mit Kulturmedium aufgenommen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Milz mit einem sterilen 1 ml Spritzenstempel durch ein Zellsieb mit der Porengröße 100 µm gerieben. Die Zellsuspension wurde in einer Petrischale aufgefangen, in 15 ml Röhrchen überführt und für 6 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet in 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Unter Hinzugabe von Kulturmedium erfolgte nach 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur ein erneuter Zentrifugationsschritt (s.o.). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml RPMI aufgenommen und ein Aliquot für die Bestimmung der Zellzahl entnommen.

### 3.2.2.4 Trypanblaufärbung

Eine Abschätzung der Zellzahl und -vitalität erfolgte durch Ausschlussfärbung mit Trypanblau. Trypanblau, als saurer Perforationsfarbstoff, durchdringt defekte Membranen toter Zellen und färbt diese durch Bindung an zytosolische Proteine an. Lebende Zellen werden dagegen kaum gefärbt. Durchgängig blau gefärbte Zellen konnten deshalb als tot betrachtet werden.

Dafür wurden jeweils 10 µl Zellsuspension im Verhältnis 1:100 mit 1 ml Trypanblaulösung versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Auszählung der vier Großquadrate und Bildung des Mittelwerts, erhielt man schließlich die Zellzahl pro Milliliter:

$$\text{Mittelwert} \times \text{Vorverdünnung (hier: } 10^2) \times 10^4 = x \text{ Zellen / ml}$$

### 3.2.2.5 Zellkultur der Splenozyten

Je Well einer 6-Well-Zellkulturplatte wurden  $1,5 \times 10^7$  Zellen in 2,5 ml RPMI mit 0,5% fetalem bovines Serum aufgenommen. Es folgte eine Äquilibrierungsphase von 15 Minuten bei RT. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 25 µl Melatonin bzw. 25 µl der Trägerlösung (Vehikel) DMSO, so dass eine 1 nM Lösung vorlag:

- 1 Well mit Melatonin (RNA-Isolierung)
- 1 Well mit DMSO (RNA-Isolierung)
- 1 Well mit Melatonin (Protein-Isolierung)
- 1 Well mit DMSO (Protein-Isolierung)

Die Splenozytensuspension wurde für 30 Minuten bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit im Wärmeschrank inkubiert.

### **3.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.3.1 Expressionsanalysen**

Bei der Arbeit mit RNA und cDNA wurde stets RNase-frei gearbeitet, d.h. es wurde ein eigener Satz Pipetten, sowie RNase-freie, sterile Pipettenspitzen und Eppendorf-Gefäße genutzt.

#### **RNA-Isolation**

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Milzgewebe erfolgte mittels der Guanidinium-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode nach Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi [139]. Diese sogenannte „single step“ Methode beruht auf dem Prinzip, dass extrahierte RNA von DNA mit Hilfe einer Guanidiniumthiocyanat, Natriumacetat, Phenol und Chloroform enthaltenden sauren Lösung und nachfolgender Zentrifugation separiert werden kann. Phenol und Guanidiniumthiocyanat bewirken eine Denaturierung der Proben, indem sie Wasserstoffbrückenbindungen aufbrechen. Durch den Einsatz von Guanidiniumthiocyanat kommt es zur Zellyse und gleichzeitig zu einer Inaktivierung von RNasen.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren mit dem RNA-Isolierungs-Kit FastTri durchgeführt. Entsprechend den Herstellervorgaben erfolgten alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte auf Eis bzw. bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge.

Zum Erntezeitpunkt wurde das Zellmedium abgenommen und bei 300 g für 6 Minuten zentrifugiert. Das Pellet mit den Monolayer-Zellen wurde aufgearbeitet.

- Monolayer-Zellen

Die auf der Platte anhaftenden Zellen wurden direkt in der Zellkulturschale durch Zugabe von 1 ml FastTri und mehrmaligem Aufziehen mit der Pipette lysiert.

- Milzgewebe

Die bei -80 °C gelagerten Milzproben wurden in 1 ml FastTri mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators homogenisiert.

Um eine vollständige Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu ermöglichen, wurden die Proben 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden pro ml FastTri 0,2 ml Chloroform 99% zugegeben und 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei RT wurde durch einen Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 12.000 g eine vollständige Trennung der Phasen erzielt. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA, während sich DNA und Proteine in der Interphase und der unteren organischen Phenol-Chloroform-Phase lösen. Zur Fällung der RNA wurde die oberste, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und mit 0,5 ml Isopropanol pro ml FastTri versetzt. Dem leichten Schwenken der Probe und einer 15-minütigen Inkubationszeit schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 g für 10 Minuten an. Das entstandene RNA-Präzipitat wurde zweimal mit 1 ml 75% Ethanol in RNase-freiem Wasser ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ , 65 °C) gewaschen, kurz bei RT getrocknet und anschließend in 10 µl DEPC-Wasser gelöst.

### **3.2.3.1.1 Kontrolle der RNA-Qualität**

#### **Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration der wässrigen Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bestimmt. Hierfür wurden die Proben jeweils 1:50 in Tris-HCl (10 mM, pH 7,0) verdünnt. Zur Hintergrundmessung wurde reines Tris-HCl verwendet. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (RNA, DNA) liegt bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm. Da die optische Dichte (OD) der RNA bei  $\lambda=260$  nm, einem pH von 7,0 und einer Küvettschichtdicke von 1 cm 40 µg / ml beträgt, ließ sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes aus der ermittelten OD die Konzentration der in der Probe vorhandenen RNA errechnen:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Vorverd\u00fcnnung (hier: 50)}$$

### **Reinheitsbestimmung**

Zus\u00e4tzlich wurde die optische Dichte bei  $\lambda=280 \text{ nm}$  ( $\text{OD}_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum f\u00fcr Proteine, bestimmt. Durch den Quotienten (Ratio) aus  $\text{OD}_{260}$  und  $\text{OD}_{280}$  konnte R\u00fcckschluss auf eine eventuelle Verunreinigung der Probe mit Protein geschlossen werden. Bei reiner RNA sollte ein Verh\u00e4ltnis \u00fcber 1,8 vorliegen. Niedrigere Koeffizienten sprechen f\u00fcr eine Kontamination mit Protein, genomischer DNA und / oder aromatischen Substanzen.

#### **3.2.3.1.2 Kontrolle der RNA-Integrit\u00e4t durch Agarose-Gelelektrophorese**

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese ist es m\u00f6glich, Nukleins\u00e4uren unterschiedlicher L\u00e4nge ihrer Gr\u00f6\u00dfe nach aufzutrennen und durch Vergleich mit den Banden eines Gr\u00f6\u00dfenstandards zu ermitteln. Durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen wandern die Nukleins\u00e4uren bei angelegter elektrischer Spannung von der Kathode zur Anode. Agarose ist ein Polysaccharid, welches aus Zellw\u00e4nden ausgew\u00e4hlter Rotalgen gewonnen wird. Durch Erhitzen des linearen und ungeladenen Molek\u00fcls in MOPS-Puffer verflechten sich die langen, unverzweigten Agarose-Molek\u00fcle zu Helizes und polymerisieren. Somit bildet sich ein Netzwerk mit Poren unterschiedlicher Gr\u00f6\u00dfe. Es konnte eine gute Auftrennung von Nukleins\u00e4uren von 400 – 7000 bp (1,2%-iges Agarose-Formaldehyd-Gel) erzielt werden.

RNA ist es als einzelstr\u00e4ngiges Molek\u00fcl m\u00f6glich, durch intramolekulare Basenpaarungen Sekund\u00e4rstrukturen auszubilden, welche die Auftrennung nach Molek\u00fclgr\u00f6\u00dfe verf\u00e4lschen k\u00f6nnen. Daher war es n\u00f6tig, durch Zugabe von Formaldehyd 37% die RNA im Vorfeld zu denaturieren. Da Formaldehyd instabile Schiff-Basen mit der Iminogruppe des Guanosin bildet, musste es im Probenpuffer und Gel vorhanden sein. Ebenfalls dem Probenpuffer zugegeben wurde Ethidiumbromid. Ethidiumbromid interkaliert im Abstand von etwa 10 Basenpaaren zwischen die Basen der RNA, wodurch sich sein Absorptionsspektrum ver\u00e4ndert und

die Fluoreszenz bei ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden RNA-Konzentration, sowie zur Länge der Nukleinsäure. Jeweils 2 µg RNA wurden in 9 µl RNA-Probenpuffer gelöst und während einer 30-minütigen Inkubation im Wasserbad bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde die Probe kurz gevortext und zentrifugiert und schließlich das 1,2%-ige Agarose-Gel beladen. Bei 100 V Gleichspannung erfolgte die Elektrophorese für 45 Minuten in MOPS 1x Laufpuffer (pH 7,0). Durch das im Probenpuffer enthaltene Ethidiumbromid konnten die RNA-Banden unter UV-Licht (302 nm) detektiert und fotografiert werden. Bei intakter RNA waren zwei deutlich getrennte Banden im Gel zu erkennen, die 28S- und 18S-Bande ribosomaler RNA. Beide entsprechen dem mengenmäßig größten Teil der Gesamt-RNA. Um eine Degradation der Gesamt-RNA auszuschließen zu können, sollte das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 28S- und 18S-rRNA 2:1 betragen. Bei guter Integrität kann zusätzlich eine schwächere 5S-Bande detektiert werden.

#### **3.2.3.1.3 DNase Verdau**

Um aus der extrahierten RNA Reste genomischer DNA zu entfernen, wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 2 µg isolierte RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 2 µl 10x DNase Puffer, 0,5 µl RNase Inhibitor und 1 µl DNase I hinzugefügt. Die verbliebene genomische DNA wurde während einer 45-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C zerstört. Durch Hinzugabe von 1 ml EDTA (50 mM) und Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C wurde die Reaktion gestoppt.

#### **3.2.3.1.4 Umschreibung in cDNA (Reverse Transkription)**

Um eine PCR durchführen zu können, muss zunächst die zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine spezifische RNA-abhängige-DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, RT). Oligo-dT-Nukleotide dienen als Primer und stellen mit ihrem freien 3'OH-Ende eine passende Hydroxygruppe als Startpunkt zur Verfügung. Produkt ist ein c-DNA-Strang, der mit dem ursprünglichen RNA-Strang hybridisiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils 1 µg der isolierten RNA mit 1 µl Oligo-dT-Primern und DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12,5 µl aufgefüllt. Nach

einer 5-minütigen Inkubationszeit bei 65 °C und anschließender kurzer Kühlung auf Eis wurde diesem Ansatz ein Mastermix aus folgenden Zutaten hinzugefügt:

Pro Ansatz:

4 µl Reaktionspuffer RT-Buffer 5x

2 µl dNTP-Mix, je 10 mM

0,5 µl RiboLock™ RNase Inhibitor

1 µl RevertAid™ Reverse Transkriptase 200 U/µl

Die anschließende Umschreibung und Inaktivierung der RT erfolgte anhand eines zweistufigen Temperaturprofils im GeneAmp PCR System 2400: 42 °C für 60 Minuten und 70 °C für 10 Minuten. Anschließend wurden die Proben mit *Aqua dest.* 1:10 verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt bzw. direkt für die qRT-PCR verwendet.

### **3.2.3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Grundlage der Polymerasekettenreaktion [140] beruht auf dem Prinzip der DNA-Vervielfältigung, welche in jeder lebenden Zelle stattfindet. Sie ermöglicht die hochspezifische und selektive Vervielfältigung kleinster cDNA-Mengen eines bestimmten Genabschnitts *in vitro*. In einer Kettenreaktion aus sich wiederholenden Temperaturzyklen wird der gewünschte DNA-Abschnitt immer wieder verdoppelt und dient als Ausgangsstoffe für den folgenden Zyklus. Somit erreicht man eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragments, komplementär zur vorliegenden Ausgangs-cDNA (Matrize). Ausgangspunkt der Vervielfältigung stellen chemisch synthetisierte, kurze Oligonukleotide (Primer) dar, welche ausgewählte Abschnitte der Matrize flankieren und zu diesen revers-komplementär sind. Diese Primer binden sequenzspezifisch an die durch Hitzedenaturierung (95 °C) erzeugten Einzelstränge der Matrize (Annealing) und werden anschließend mithilfe der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase polymerisiert (Elongation, 72 °C).

### **3.2.3.1.6 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)**

Die Real-Time PCR basiert auf dem gleichen Prinzip wie die klassische PCR [140]. Grundlage hierfür stellt die von Higuchi *et al.* beschriebene [141], welche eine Quantifizierung der Amplifikate über die Zeit erlaubt, ohne dabei störend in die PCR einzugreifen. Während bei der klassischen PCR die Sichtbarmachung der amplifizierten DNA-Sequenz über eine gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-



Produktes erfolgt, bedient sich die Real-Time-PCR DNA-interkalierender Farbstoffe zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität in der Reaktionslösung, welche mit fortschreitender Vervielfältigung der DNA zunimmt. Während des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenz korreliert diese direkt mit der relativen Zunahme der DNA-Menge und erlaubt damit Rückschlüsse auf die Startkopienzahl der untersuchten DNA-Sequenz, und damit auf die Expression der Zielgene.

Vor Beginn der Expressionsanalysen wurde die PCR-Reaktion für mehrere Parameter, wie  $MgCl_2$ -Konzentration, Annealingtemperatur und -zeit sowie Konzentration an Oligonukleotidprimern und Fluoreszenzfarbstoff optimiert. In dieser Arbeit wurde das qRT-PCR Reaktionskit (5x Hot Start Taq EvaGreen® qPCR Mix) mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® verwendet. Die Menge des gebundenen Farbstoffes wurde am Ende jedes Hybridisierungsschrittes mit einer Kamera registriert und dargestellt. Die Primer (Tab.3) wurden nach Auswahl der auf NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hinterlegten Sequenzen mit Hilfe der Clone Manager Suite 7 von Sci-Ed Software erstellt und anschließend von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Dabei wurde die Lage der Primer möglichst intronüberspannend gewählt, sodass eine cDNA spezifische Amplifikation gewährleistet und die Amplifikation unerwünschter genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte oder die Amplifikation genomischer DNA durch ein größeres Produkt unterschieden werden konnte.

Tab. 3: Primer für die qRT-PCR

Gen	Gene-ID	Primer	Produkt-Größe	Annealing-Temperatur
Cxcl2	20310	AGT GAG CTG CGC TGT CAA TG CAG TTA GCC TTG CCT TTG TTC	209 bp	60 °C
CxcR2	12765	GAG GAC AAG GTC CCA AAT G CAG CTA GAG CCA CAA GTT C	169 bp	56 °C
Icam-1	15894	ATG GGT CGA GGG TTT CTC TAC CAT GAG CAT GAG GCT CGA TTG	202 bp	56 °C
Il-1 $\beta$	16176	AAA TAC CTG TGG CCT TGG G GAG GTG CTG ATG TAC CAG TTG	211 bp	60 °C
Il-2	16183	CAA GCA GGC CAC AGA ATT G GAA GGC TAT CCA TCT CCT CAG	235 bp	58 °C
L-Selektin	20343	TCA GAC TCC TTG CGC ATA G GTG GCT GTC ACT CAC AGA TAG	138 bp	56 °C
Rps 16	20055	ATA TCC GGG TCC GTG TGA AGG CCG CCA AAC TTC TTG GAT TCG C	220 bp	60 °C
Sdha	66945	AGA CGT TCG ACA GGG GAA TG CAT CGA CCC GCA CTT TGT AAT C	159 bp	58 °C
TNF $\alpha$	21926	TAG CCC ACG TCG TAG CAA AC GAG ATA GCA AAT CGG CTG ACG	217 bp	60 °C

Alle PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 20  $\mu$ l in 96-well-Reaktionsplatten durchgeführt. Zur Überprüfung auf mögliche Kontamination wurde in jedem Lauf eine Negativkontrolle ohne cDNA mitgeführt (NTC).

#### Pro Ansatz:

12  $\mu$ l Aqua dest.

4  $\mu$ l 5x Hot Start Taq EvaGreen® qPCR Mix

2  $\mu$ l Oligo(dT)-Oligonukleotid Primermix (je 250 pM)

2  $\mu$ l cDNA (1:10 verdünnt)

Die Reagenzien wurden im Mastermix ohne cDNA angesetzt, aliquotiert und die cDNA anschließend separat hinzugefügt. Mit Hilfe des Thermocyclers konnte

schließlich die vollautomatisierte Durchführung verschiedener temperaturabhängiger Reaktionen ermöglicht werden (Tab.4):

**Tab. 4: Programm zur qRT-PCR**

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit	
Initiale Denaturierung	95	15 Min.	
Denaturierung	95	15 Sek.	} 40 x
Hybridisierung	55 – 60	20 Sek.	
Elongation	72	20 Sek.	
	72	1 Min.	
	10	1 Min.	

Zur Unterscheidung von spezifischen Produkten und Primerdimeren erfolgte im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurvenanalyse. Hierfür wurden die Proben zur Kontrolle der Amplifikate im Anschluss an den letzten Zyklus langsam von 50 °C auf 95 °C erhitzt und dabei die Fluoreszenzintensität gemessen. Abhängig von der Nukleotidlänge und –zusammensetzung kommt es bei der Schmelztemperatur zur Denaturierung des DNA-Doppelstrangs mit Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes und damit zu einem plötzlichen Abfall der Fluoreszenzintensität. Dargestellt als gemessene Fluoreszenz (F) über die Zeit und die resultierende erste Ableitung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur (T) („Melt Peak Curve“) zeigt sich der Schmelzpunkt als Peak.

Um die genaue Fragmentlänge zu verifizieren, wurde nach jedem qRT-PCR-Lauf eine gelelektrophoretische Auftrennung des amplifizierten Produktes durchgeführt. Hierfür wurden die Proben im Verhältnis 1:6 mit Loading Dye Solution vermischt und davon 10 µl in die Taschen des Agarosegels geladen. Als Größenmarker wurde der 100 bp DNA-Leiter GeneRuler™ (Fa. Fermentas) verwendet. Nach einem 30-minütigen Lauf bei 80 Volt Gleichspannung in 1x TAE-Puffer erfolgte die Analyse der erhaltenen DNA-Banden unter UV-Licht im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.

#### **3.2.3.1.7 Auswertung der qRT-PCR**

Zur Auswertung der qRT-PCR wurden in dieser Arbeit die Quantifizierungszyklen C<sub>q</sub> (Cycle of quantitation) entsprechend der C<sub>y0</sub>-Methode nach Guescini *et al.* bestimmt [142]. Diese Methode basiert auf der Angleichung der Rohdaten an die 5-Parameter Richards-Gleichung mittels nicht-linearer Regression. Dabei entspricht der C<sub>q</sub>-Wert

dem Schnittpunkt der Abszisse mit der Tangente im Wendepunkt der Richards-Gleichung und ist somit ein direktes Maß der DNA-Menge in der Probe [142].

Um Störfaktoren auszuschließen und die relative cDNA-Menge bestimmen zu können, wurde anschließend eine Normalisierung der Gene über einen Abgleich mit den Expressionswerten der Haushalts-Gene SDHA (Succinat-Dehydrogenase) und Rps16 durchgeführt. Zur Normalisierung und Auswertung der relativen Expressionsunterschiede der Proben zwischen Behandlung und Kontrolle, normalisiert auf das Referenzgen, wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak herangezogen [143]. Zur Kontrolle diente für alle Proben der mittlere Expressionswert der unbehandelten, direkt eingefrorenen Milz (WT Splenozyten vs. WT Sham Milz, bzw. KO Splenozyten vs. KO Sham Milz).

Die Bestimmung der qRT-PCR Rohdaten, der Cq-Werte und der Schmelzpunkte erfolgte mittels des Softwarepakets Bio-Rad CFX Manager<sup>®</sup> Version 1.6.541.1028 (Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA); die Auswertung mit Microsoft<sup>®</sup> Office Excel<sup>®</sup> 2007 (©2006 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot<sup>®</sup> für Windows mit SigmaStat<sup>®</sup>-Integration (SigmaPlot<sup>®</sup> Version 9.01 Systat Software, Inc., Chicago, USA).

### **3.2.3.2 Proteinanalytik**

#### **3.2.3.2.1 Proteinisolation**

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Zellmedium verworfen und die Wells einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der am Boden der Zellkulturschale anhaftende Zellrasen mit jeweils 100 µl Lysepuffer (Cell Signaling + 5% PMSF) abgelöst und mit einem Zellschaber mechanisch entfernt. Einer kurzen Lyse im Ultraschallbad auf Eis schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 12000 rpm an. Hierdurch setzte sich der Zelldetritus ab und die so erhaltenen Zelllysate wurden bis zur Aufbereitung bei -80 °C eingefroren.

#### **3.2.3.2.2 Proteinbestimmung**

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat erfolgte mittels Bradford Assay [144]. Zur Messung des Proteingehaltes wurden 1 µl Probe mit 1 ml Farbstofflösung (Rotiquant 1:5 verdünnt in Aqua dest.) in Küvetten gemischt und 5 Minuten bei RT bis zur Ausbildung stabiler Farbstoff-Protein-Komplexe inkubiert. Die

Extinktion wurde anschließend im Photometer bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen und die Werte gegen eine BSA-Standardkurve kalibriert.

### **3.2.3.2.3 Western Blot**

#### **Prinzip**

Durch Auftragen der isolierten und denaturierten Proteine des Zelllysats auf ein Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) werden diese nach Größe und Ladung elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Blotting Membran übertragen. Mittels spezifischer Antikörper können die Proteine in Form von Banden auf dieser Membran markiert und über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz nachgewiesen werden.

#### **Probenvorbereitung**

Zum Aufkonzentrieren der Proteine für die Durchführung einer SDS-PAGE wurden jeweils 200 µg gepooltes Protein pro Gruppe mit 200 µl TCA 10% gefällt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis und Zentrifugation wurde das Präzipitat zweimal mit eiskaltem 80%-igem Aceton gewaschen und anschließend in vier Ansätzen à 50 µg in 12,5 µl Lysepuffer mit PMSF und 2 µl SDS 20% resuspendiert. Der pH-Wert wurde mit jeweils 1,5 µl Tris 1 M (pH 7,5) vorsichtig korrigiert und die Proben für 24 Stunden bei -80 °C eingefroren. Nach Auftauen der Zelllysate wurde jeder Ansatz zu gleichen Volumenanteilen mit 2x Laemmli-Probenpuffer und 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt.

#### **SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)**

Um eine hohe Auflösung zu ermöglichen, wurde zur Auftrennung der Proteine hinsichtlich ihrer molekularen Größe eine denaturierende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [145] durchgeführt. Sie erfolgte nach dem Protokoll für Tris-Glycin SDS-PAGE von Sambrook und Russell [146]. Dabei werden die zu trennenden Proteine mit dem Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) und dem reduzierenden Reagenz β-Mercaptoethanol denaturiert. SDS, als anionisches Tensid, überdeckt zusätzlich die Eigenladung der Proteine, sodass eine konstante negative Ladungsverteilung entsteht und dadurch eine Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist.

Zur Auftrennung der Proben wurde ein vertikales 5%iges Sammelgel und ein 12%iges Trenngel aus der gebrauchsfertigen 30%igen Acrylamid / Bisacrylamid-Mischung (Rotiphere® Gel 30, Mischungsverhältnis 37,5:1) hergestellt. Nach Zugabe des Radikalinitiators Ammoniumpersulfat (APS) und des Katalysators TEMED bildete sich durch radikalische Kettenreaktion ein feines, gleichmäßiges Netz. Zur Ausformung von Geltaschen wurde vor der Polymerisation ein Kunststoffkamm luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt.

Nach Auspolymerisieren des Gels wurden die Kämmе vorsichtig aus dem Gel entfernt und die Taschen mit jeweils 25 µl (50 µg) Probe, 25 µl Negativkontrolle bzw. 5 µl Molekularmarker (Thermo Fisher Scientific) beladen. Der Gellauf erfolgte in einfach konzentriertem LLP-Laufpuffer bei 50 V bis zum Erreichen der Sammelgel-/Trenngelgrenze und anschließend für 60 Minuten bei 70 V. Eine optische Kontrolle der Elektrophorese wurde über die Auftrennung des angefärbten Molekularmarkers ermöglicht.

### **Blot**

Mit Hilfe eines Tankblot-Verfahrens werden die aufgetrennten Proteine im Puffertank auf eine PVDF-Membran transferiert. Aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche haften und sind für eine Detektion mit spezifischen Antikörpern zugänglich.

Hierfür wurden die PVDF-Membran, nachdem sie in Methanol aktiviert wurde, das zu blottende Gel, Filterpapiere und die Fasermatten in einfach konzentriertem Transferpuffer äquilibriert. Entsprechend dem Nass-Blot-Verfahren wurde ein Sandwich aus Membran, Gel und Filterpapieren in einer Transferkassette luftblasenfrei zusammengestellt und vollständig in eine Blotkammer mit eiskaltem Transferpuffer eingetaucht. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 250 mA unter Kühlung für 2 h. Dabei diente der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker als Kontrolle der Transfereffizienz. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurden die Gele nach dem Transfer mit Coomassie-Brillantblau angefärbt.

### **Proteinmarkierung und Antigendetektion**

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Transfer für mindestens 60 Minuten bei RT in 4% SlimFast leicht geschwenkt. Es

folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern in der angegebenen Verdünnung (Tab.5) über Nacht bei 4 °C.

**Tab. 5: Primär-Antikörper für Western Blot (Cell Signaling)**

Antikörper		Lösung
p-Akt	#4060	1:2000 in 1xTTBS
p-ERK 1/2	#4370	1:2000 in 1xTTBS
p-p38	#4511	1:1000 in 1xTTBS
p-JNK	#4668	1:1000 in 1xTTBS
Akt	#4691	1:1000 in 1xTTBS
ERK 1/2	#4695	1:1000 in 1xTTBS
p38	#8690	1:1000 in 1xTTBS
JNK	#9258	1:1000 in 1xTTBS

Nach zweimaligem Waschschrift für 5 Minuten in 1x TBS erfolgte eine 2-stündige Inkubation der Membranen mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:5000). Dieser ist gegen die Fc-Fragmente der primären Antikörper gerichtet. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers wurde dabei auf 1:5000 in 1xTTBS festgelegt. Zwei erneute Waschschriffe (zweimal 5 Minuten in 1x TBS) sorgten für die Entfernung überschüssiger, unspezifisch gebundener Sekundärantikörper von der Membran. Anschließend erfolgte die Detektion des über den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers mit einer *enhanced-chemiluminescence* (ECL)-Lösung des ECL-Kits entsprechend den Angaben des Herstellers Amersham.

### Strippen der Membran

Das Strippen der Membran ist das Entfernen des 1. und 2. Antikörpers von der Western Blot-Membran. Nach Detektion des phosphorylierten Proteins wurde als individueller Standard das Gesamtprotein auf der gleichen Blot-Membran detektiert. Die Membranen wurden dazu zweimal in einfach konzentriertem TTBS-Puffer für jeweils 5 Minuten gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei 56 °C in Stripping Puffer schüttelnd inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen in TTBS für je 20 Minuten erfolgte die Blockierung der Membranen über Nacht in 4% SlimFast. Am nächsten Tag folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern anti-Akt, anti-ERK1/2, anti-p38 und anti-JNK in oben beschriebener Verdünnung (Tab.5).

### **Western Blot Auswertung**

Die Chemilumineszenz wurde mit der gekühlten 16-Bit-CCD-Kamera des Chemilumineszenz Imaging System 4.2 (Fa. Biostep) während einer Expositionszeit von 60 Minuten detektiert. Die Intensität der Banden konnte anschließend mit der Software TotalLab Quant (v11) densitometrisch quantifiziert werden. Durchgehende Hintergrundartefakte wurden durch den „*Rolling Ball*“-Algorithmus entfernt. Nach Normalisierung auf das Gesamtprotein wurde eine Kalibrierung auf die Kontrollgruppe (WT Sham Vehicle) durchgeführt.

### **3.2.3.3 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

#### **3.2.3.3.1 Funktionsprinzip**

ELISA bezeichnet ein hochspezifisches, antikörperbasiertes Nachweisverfahren, gekoppelt an eine enzymatische Farbreaktion. Die Bestimmung des Gehaltes an TNF $\alpha$  im Plasma erfolgte, anlehnend an die Erstbeschreibung durch Engvall und Perlmann, in der Sandwich-Methode [147]. Hierbei werden zwei Antikörper verwendet, welche beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Um eine gegenseitige Behinderung der Antikörper zu vermeiden, binden beide an unterschiedlichen Stellen, sog. Epitopen, des Antigens. Nach der Beschichtung der Mikrotiterplatter mit einem spezifischen Fangantikörper (capture antibody) wird das nachzuweisende Antigen hinzugefügt. Durch Bindung eines biotinylierten Detektionsantikörpers an das Antigen entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Zur Quantifizierung des Ergebnisses wird ein an Streptavidin gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt. Da Streptavidin sehr spezifisch und stark an Biotin bindet, kann der biotinylierte erste Antikörper nach Hinzugabe eines passenden chromogenen Substrats über den Streptavidin-Fluoreszenzkomplex detektiert werden.

#### **3.2.3.3.2 Durchführung**

In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung des Zytokins TNF $\alpha$  mithilfe eines spezifischen kommerziell erhältlichen ELISA-Kits der Firma BD Biosciences, San Diego, USA gemäß der vom Hersteller angegebenen Analysetechnik.

96-well-Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4 °C mit 50  $\mu$ l/well Anti-Rat TNF $\alpha$ -Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde hierfür laut Herstellerempfehlung in einer



Konzentration von 1:250 in 0,1 M Carbonat-Bicarbonatpuffer eingesetzt. Nach Entfernen des Puffers wurden die Platten fünfmal mit PBS-Tween gewaschen. Durch Hinzugabe von jeweils 200 µl Assay Diluent wurden die nichtbesetzten Bindungsstellen der Wells für 60 Minuten bei Raumtemperatur blockiert und nach Entfernen erneut fünfmal gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Negativkontrolle (Assay Diluent) sowie jeweils 50 µl der Plasmaproben. Für korrekte quantitative Ergebnisse wurde unter Verwendung des lyophilisierten, rekombinanten Ratten-TNF $\alpha$ -Standards eine Standardkurve erstellt. Diese wurden ebenfalls in Assay Diluent angesetzt und als Duplikate in Verdünnungen von 31,3 pg/ml bis 2000 pg/ml pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Nach Entfernen der Proben wurden die Wells fünfmal mit jeweils 200 µl PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurden je 50 µl / Well biotinylierter Primärantikörper in einer Konzentration von 1:250 zugegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach fünf gründlichen Waschschritten wurde jeweils 50 µl des HRP-Konjugats (1:250) hinzugegeben. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe des TMB (Tetramethylbenzidine) Substrates BD OptEIA™ (100 µl pro Well) über eine Farbreaktion visualisiert. Nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten bei RT im Dunkeln wurde die Reaktion mittels 50 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt und die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450/620 nm im ELISA-Reader detektiert.

### **3.2.4 Software und Statistik**

#### **3.2.4.1 Verwendete Computerprogramme**

Die Dissertationsschrift wurde in Microsoft® Office Word® 2007 (©2006 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) angefertigt. Zur Bildbearbeitung wurden die Programme CorelDRAW® 10.0 (©2000 Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada) und GIMP 2.8 verwendet. Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe der Clone Manager Suite 7 (Sci-Ed Software, Cary, North Carolina, USA).

Die Erhebung der RT-qPCR-Rohdaten, der C<sub>q</sub>-Werte und der Schmelzpunkte erfolgte mittels des Softwarepakets Bio-Rad CFX Manager® Version 1.6.541.1028 (Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA). Die Berechnung der Extinktionen im ELISA-Reader wurden mit Hilfe der Datenanalyse-Software Gen5™ Version 1.0 (Fa. Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont, USA) durchgeführt. Zur

quantitativen Bildanalyse der Bandenintensitäten im Western Blot wurde das Kern-Analyse-Tool TotalLab Quant (Fa. TotalLab Ltd., Newcastle, UK) genutzt.

Die weiteren Auswertungen und statistischen Analysen erfolgten mit den Programmen SigmaPlot<sup>®</sup> for Windows mit SigmaStat<sup>®</sup>-Integration (SigmaPlot<sup>®</sup> Version 9.0 Systat Software, Inc., Chicago, USA) und Microsoft<sup>®</sup> Office Excel<sup>®</sup> 2007 (©2006 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

#### **3.2.4.2 Statistische Auswertung, grafische Darstellung**

Zur statistischen Auswertung erfolgte die Normalisierung und Kalibrierung auf die unbehandelten Kontrollgruppen (WT Sham- oder KO Sham Splenozyten). Nach Überprüfung der Messwerte auf Normalverteilung durch den Kolmogorov-Smirnov-Test wurden Gruppenunterschiede, entsprechend der Probenanzahl ( $n = 5$ ), mittels einfaktorieller Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis bestimmt und anschließend durch multiplen Vergleich nach Student-Newman-Keul analysiert. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurden zur Darstellung von Gruppenunterschieden nichtparametrische Testverfahren in zwei Stufen herangezogen. In der ersten Stufe wurde mittels einer nichtparametrischen Einweg-Varianzanalyse (nonparametric One-Way ANOVA) für Mehrfachvergleiche nach Kruskal-Wallis getestet, ob signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen bestehen. Hierbei wurden  $p$ -Werte  $< 0,001$  als statistisch signifikant angesehen. Um eine Aussage über das Signifikanzniveau der Unterschiede zu erhalten, wurde in einer zweiten Stufe eine „post-hoc“-Testung mittels des ebenfalls nichtparametrischen Tests für Mehrfach-Vergleiche (Multiple-Comparisons-Test) nach Dunn genutzt. Hier wurde die erlaubte Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese bzw. die Irrtumswahrscheinlichkeit auf  $p < 0,05$  festgelegt. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $MW \pm SD$ ) wurden schließlich in Übersichtsform mit Hilfe von Streudiagrammen (Scatterplot) grafisch visualisiert.

#### **3.2.4.3 Web-Quellen**

Die Literaturrecherche erfolgte mit Hilfe der Meta-Datenbank PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Die Recherche und Analyse von DNA- und RNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe folgender Web-Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Qualitätskontrollen der molekularbiologischen Experimente

Um eine fehlerfreie Interpretation und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden im Rahmen der molekularbiologischen Experimente Qualitätskontrollen durchgeführt.

#### 4.1.1 Qualitätskontrolle der RNA

##### Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der Proben

Bei der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung der Proben kann durch Ermittlung des Quotienten aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  auf eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA, Proteinen oder aromatischen Substanzen geschlossen werden. Bei reiner RNA sollte das Verhältnis über 1,8 liegen (vgl. 3.2.3.1.1). Die hier verwendeten Proben hatten alle Werte über 2,23.

##### Kontrolle der RNA-Integrität durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Integrität der RNA wurde in allen Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Bei allen Proben sind die 28S, 18S und 5S Banden deutlich voneinander abzugrenzen. Die 28S Bande erscheint dabei jeweils doppelt so stark wie die 18S Bande. Alle hier verwendeten Proben entsprachen der exemplarisch dargestellten RNA-Gelelektrophorese (Abb.9).

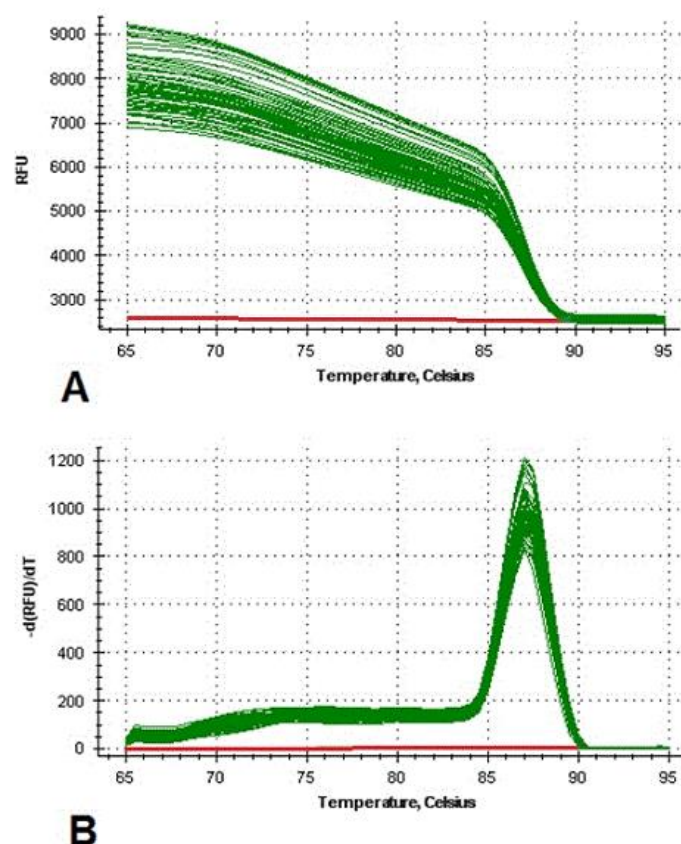


**Abb. 9: RNA-Gelelektrophorese**

Beispiel einer RNA-Gelelektrophorese von nicht degradierter RNA aus Milzgewebe. Exemplarisch dargestellt sind hier 6 Proben aus der WT Sham Versuchsgruppe. Deutlich sichtbar sind die 3 Banden (entsprechend der 28S, 18S und 5S ribosomalen Untereinheiten) und die etwa doppelte Signalintensität der 28S-Bande im Vergleich zur 18S-Bande. (1,2 %iges RNA-Elektrophoresegel, 80 V 35 min in MOPS 1x Laufpuffer)

### 4.1.2 Qualitätskontrolle der qRT-PCR-Reaktion

Zur Verifikation der Amplifikate wurde nach jeder qRT-PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abb. 11). Alle verwendeten Proben wiesen in der Fluoreszenz-Schmelzkurve nur einen steilen Abfall des Fluoreszenzsignals am Schmelzpunkt des erwarteten Produkts auf, bzw. einen Peak, bei Auftragung der resultierenden ersten Ableitung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur („Melt Peak Curve“). In keiner der NTC konnte ein Anstieg des Fluoreszenzsignals detektiert werden.

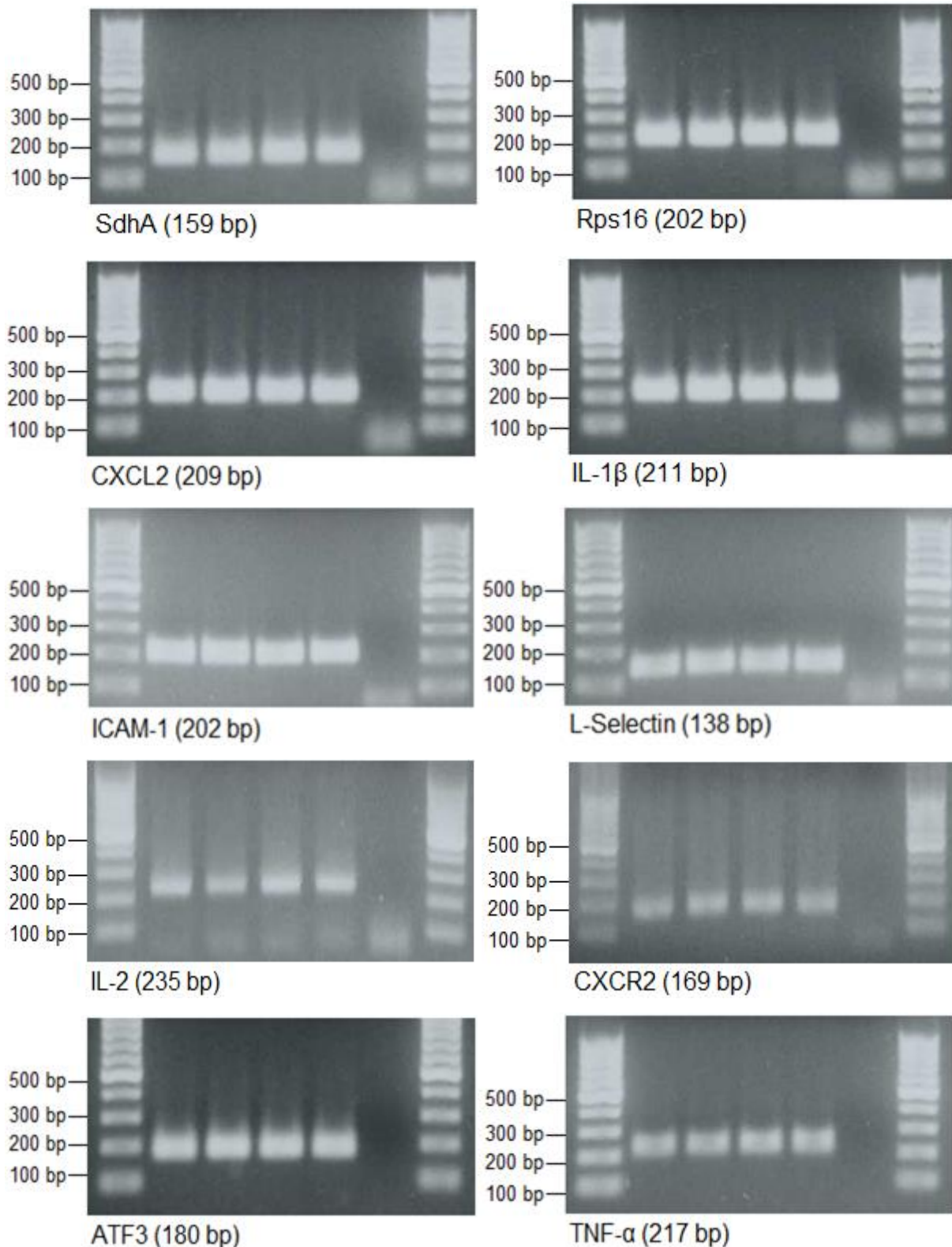


**Abb. 10: Schmelzkurve nach qRT-PCR**

Beispiel einer Schmelkurvenanalyse (Exemplarisch dargestellt ist hier ein qRT-PCR-Lauf mit IL-2 Primern.) RFU = Relative Fluorescence Units (dt. relative Fluoreszenzeinheiten),  $-d(RFU)/dT$  = erste Ableitung der RFU, grüne Kurven = Proben mit IL-2 Primern, rote Kurve = NTC mit IL-2 Primern

Abb. 10A zeigt die Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur. Hier ist der Abfall der Signalintensität am Schmelzpunkt der Proben zu erkennen, Abb. 10B zeigt bei gleichen Daten die erste Ableitung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur („Melt Peak Curve“), wo sich der Schmelzpunkt als Peak in den Graphen zeigt. Zu erkennen ist das Fehlen eines Fluoreszenzsignals in der NTC (rot). Weiterhin zeigt sich in jeder Probe nur ein Peak am primerspezifischen Schmelzpunkt (ca. 87,50 °C für IL-2 Primer (grün)).

Zum spezifischen qualitativen Nachweis der PCR-Produkte über die Fragmentlänge, wurde nach jedem qRT-PCR-Lauf eine gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Produkte durchgeführt (vgl.3.2.3.1.6). Alle verwendeten Proben wiesen dabei, im Vergleich zum Längenstandard, lediglich eine spezifische Bande auf, welche eindeutig der Größe des zu erwarteten PCR-Produktes zugeordnet werden konnte. In der NTC konnte kein Amplifikat nachgewiesen werden. Für jedes eingesetzte Primerpaar sind die gelelektrophoretischen Auftrennungen in Abb. 12 beispielhaft dargestellt.

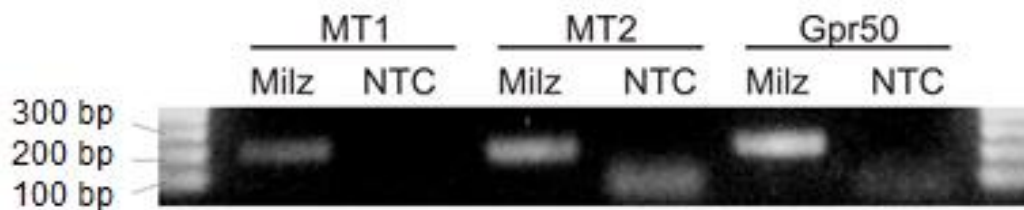


**Abb. 11: Kontrollgelelektrophoresen nach qRT-PCR**

Gelelektrophoresen der Amplifikate aus einem qRT-PCR-Lauf für jedes eingesetzte Primerpaar. Von links nach rechts jeweils Marker, exemplarisch je eine Probe der Gruppe WT Sham, WT CLI, KO Sham, KO CLI, Kontrollansatz (NTC), Marker. In jeder Probe tritt nur eine spezifische Bande auf, die der erwarteten Produktgröße entspricht. Es sind keine Nebenprodukte in den Proben vorhanden. Marker: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

## 4.2 Nachweis von Melatoninrezeptoren in der Milz

Zum Nachweis vorhandener Melatoninrezeptoren auf Splenozyten wurde die mRNA-Expression von MT1, MT2 und Gpr50 (Melatonin-assoziiertes *orphan* Rezeptor) untersucht. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend durch Sequenzierung bestätigt. Abb. 12 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Elektrophoresen. Bei allen drei eingesetzten Primerpaaren lässt sich eine deutliche Bande im entsprechenden Längenbereich erkennen.

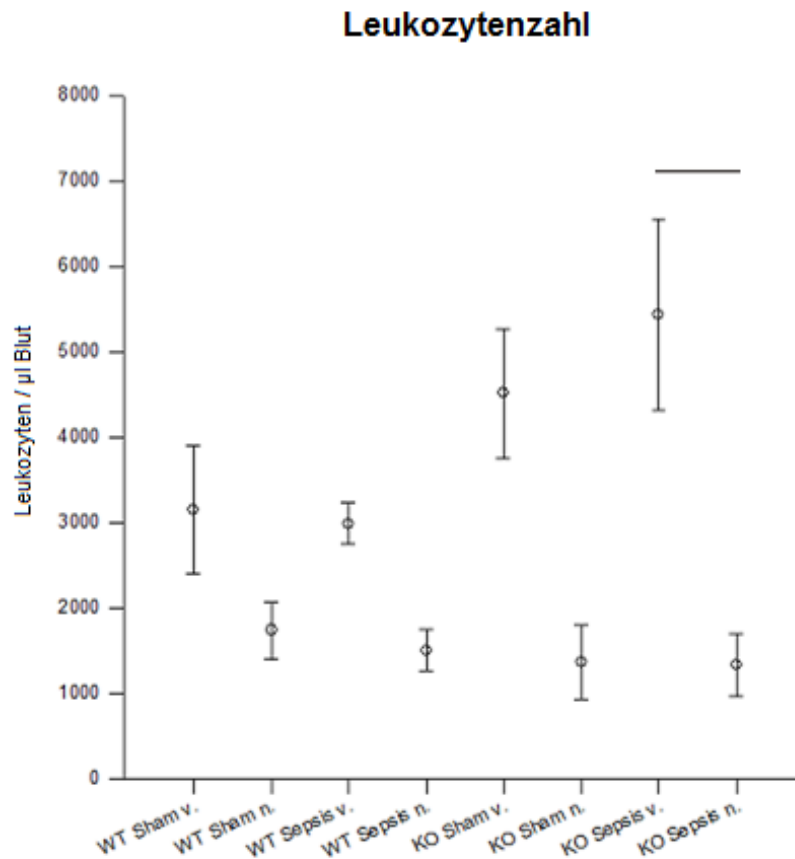


**Abb. 12: Gelelektrophorese von MT1- und MT2-Rezeptor-, sowie Gpr50-spezifischen Amplifikationsprodukten aus isolierten Splenozyten nach qRT-PCR.**

Neben den Rezeptoransätzen wurde jeweils ein Kontrollansatz (NTC) aufgetragen. Marker: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

## 4.3 Leukozyten

Unmittelbar nach Narkoseeinleitung und zum Ende des Beobachtungszeitraums wurde eine Leukozytenzählung in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt (vgl. 3.2.2.1). Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt. In allen Gruppen konnte ein deutlicher Abfall der Leukozyten über die Zeit festgestellt werden, welcher sich jedoch nur in der KO Sepsis-Gruppe als signifikant darstellte. Unabhängig von der Therapie sind sowohl in beiden WT-, als auch in den KO-Gruppen die Ausgangs- und Endwerte annähernd gleich. Während die Werte am Ende des Beobachtungszeitraums in allen Gruppen auf einheitlich niedrige Werte sinken, besteht in den KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren die Tendenz zu höheren Ausgangswerten.



**Abb. 13: Leukozytenzahl**

Dargestellt sind die Leukozyten / µl Blut mit MW ± SD innerhalb der verschiedenen Therapiegruppen (Milzgewebe). Der schwarze Balken im oberen Teil der Abbildung kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen ( $p < 0,05$ ). v: Zeitpunkt 1; n: Zeitpunkt 2

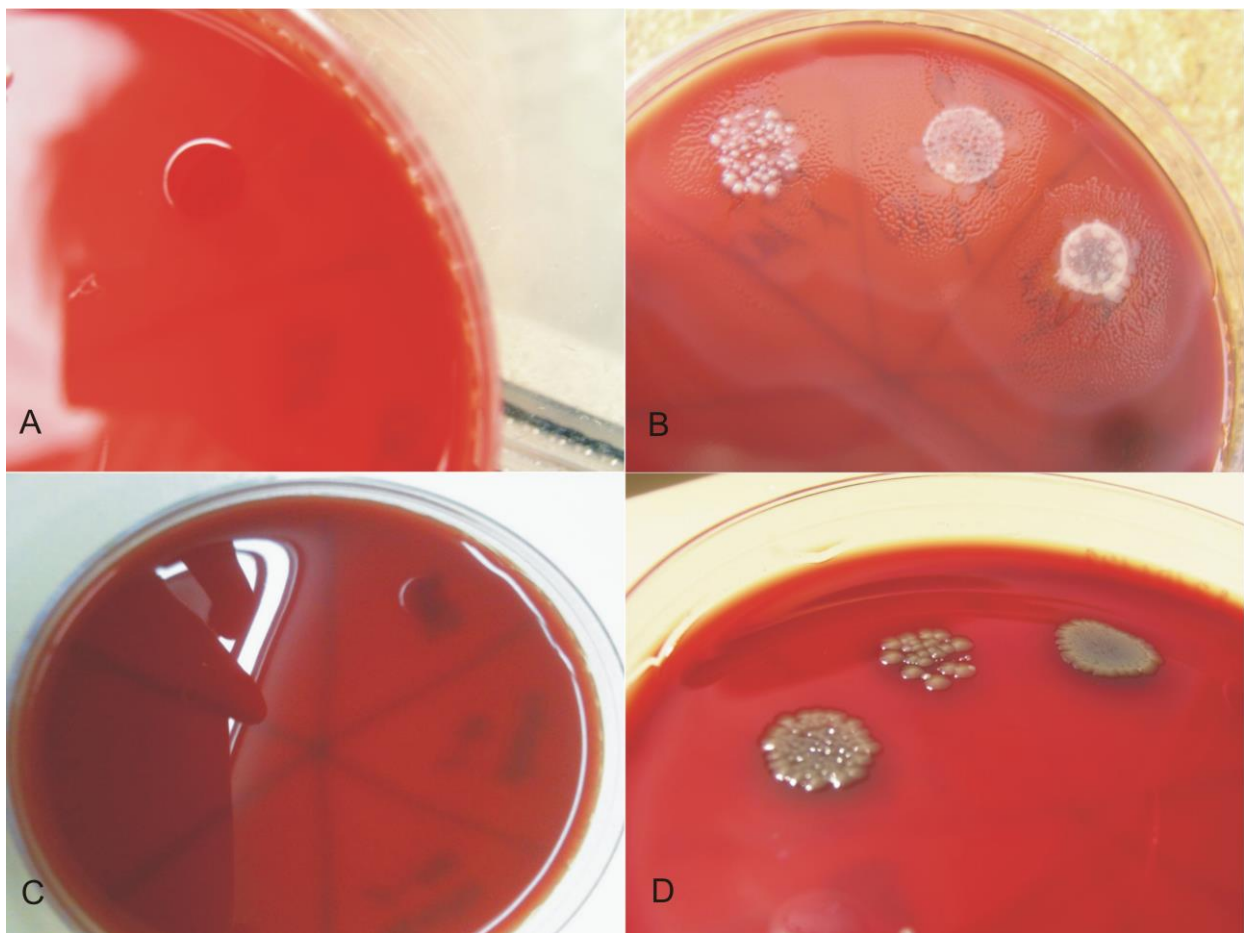
#### 4.4 Bakterienkultur

Nach Beendigung des Beobachtungszeitraums wurden zum Nachweis einer induzierten CLI und als Hinweis auf eine vorliegende Sepsis Blutagarplatten mit jeweils 10 µl entnommenem Blut bzw. Aszites beimpft und anschließend bebrütet. Nach 24 h erfolgte die Wachstumsanalyse. Die Sham-Tiere dienten als Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind exemplarisch für jede Therapiegruppe in Abb. 14 dargestellt. Im Falle der Aszites-Untersuchung war sowohl in den Proben der WT Sham- (A), als auch der KO Sham-Tiere (C) kein Wachstum zu verzeichnen. Im Aszites der KO-Sepsis-Gruppe (D) fand sich ein Wachstum mehrerer kleiner, weiß-gräulicher Kolonien. Diese erschienen rund und glatt begrenzt, sowie konvex erhaben. Eine Hämolyse lag nicht vor. Auch in der WT-Sepsis-Gruppe (C) konnten



o.g. Kolonien identifiziert werden. Zusätzlich fanden sich hier konzentrische Schwärmmringe um die punktförmige Inokulationsstelle, was a. e. für eine Besiedlung mit *Proteus* spricht. Das nachgewiesene Wachstum bei WT- und KO-Tieren weist auf eine erfolgreiche Sepsisinduktion mittels CLI in beiden Versuchstiergruppen hin. Gleichzeitig gilt, dass die Sham-Behandlung ebenfalls erfolgreich war, da aus ihrem Aszites kein Keim isoliert werden konnte.

Im Falle der angelegten Blutkulturen konnte nach 24 h in keiner der vier Versuchsgruppen ein Wachstum verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 14: Bakterienkultur Aszites**

A: WT Sham, B: WT Sepsis, C: KO Sham, D: KO Sepsis

## 4.5 Genexpressionsanalysen

In dieser Arbeit sollte die Expression immunspezifischer Gene in Splenozyten im Modell des septischen Schocks evaluiert werden. Dabei sollte die Relevanz der transkriptionellen Beeinflussung dieser Gene durch Melatonin in der günstigen Wirkung auf die Immunfunktion untersucht werden.

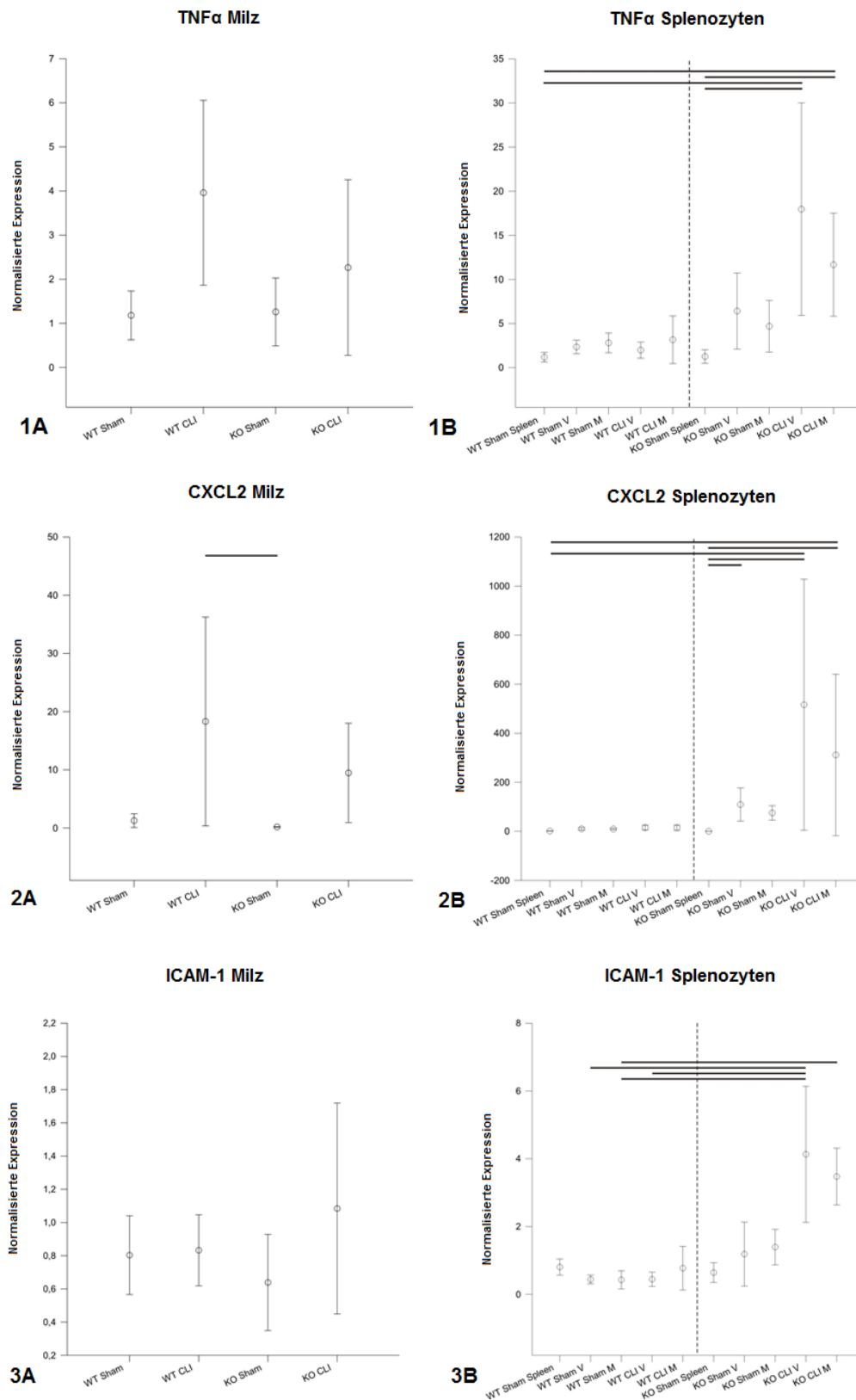
Hierzu wurden Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR an isolierten Splenozyten der Versuchstiere durchgeführt und entsprechend dem Modell nach Livak in Relation zum mittleren Expressionswert der unbehandelten Kontrollgruppe (WT Sham Milz bzw. KO Sham Milz) ausgewertet (vgl. 3.2.3.1.7).

Die Berechnung der Expressionswerte erfolgte anhand des Modells nach Livak in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe (WT Sham Milz bzw. KO Sham Milz). Als Referenz wurde hier der Mittelwert der Kontrollgruppe verwendet.

Gene mit ähnlichem Expressionsverhalten werden nachfolgend gemeinsam vorgestellt.

### 4.5.1 Expressionsanalysen von TNF $\alpha$ , CXCL2 und ICAM-1

Die Versuchstiere in den Kontrollgruppen zeigten konstant niedrige Expressionen von TNF $\alpha$ , CXCL2 und ICAM-1. Gegenüber diesen Basalwerten schienen nach 1 h CLI die Expressionen von TNF $\alpha$  und CXCL2 in den Milzen tendenziell erhöht zu sein, während sich die ICAM-1 Expression nicht veränderte. Eine Signifikanz konnte dabei lediglich bezüglich CXCL2 zwischen WT CLI und KO Sham beobachtet werden (Abb. 15A). Nach Kulturnahme fanden sich in den KO-Tieren unter CLI signifikant erhöhte Expressionen, welche durch Melatonin gesenkt werden konnten. In den WT-Splenozyten konnte, unabhängig von der Therapie, kein Anstieg der Expressionen dargestellt werden (Abb. 15B).

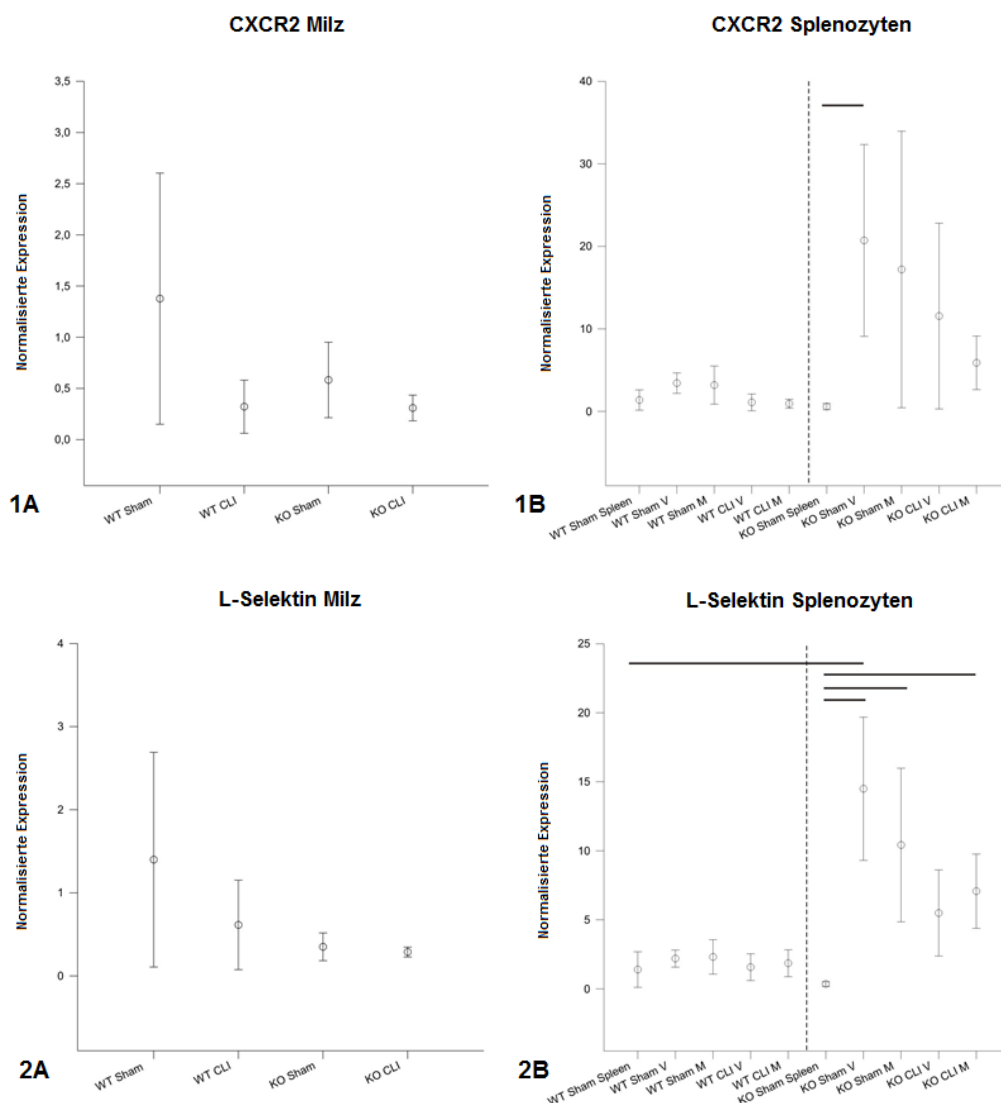


**Abb. 15: Relative Expression von TNFα, CXCL2 und ICAM-1 in den Therapiegruppen**

Normalisierte Expression von TNFα (1), CXCL2 (2) und ICAM-1 (3) in schockgefrorenem Milzgewebe (A) und isolierten Splenozyten nach 30 Minuten Zellkultur (B). Für jede Gruppe sind MW und SD abgebildet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse und einem sich anschließenden paarweisen Vergleichstest nach Dunn (Signifikanzniveau < 0,05). Der schwarze Balken kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen. V: Vehikel, M: Melatonin

### 4.5.2 Expressionsanalysen von CXCR2 und L-Selektin

Bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe zeigten sich konstant niedrige Expressionen von CXCR2 und L-Selektin, die sich auch nach 1 h CLI in den Milzproben nicht änderten (Abb. 16A). Während sich die Genexpression in den WT-Splenozyten nicht veränderte, induzierte die Kulturnahme der KO-Splenozyten eine Hochregulation der CXCR2- und L-Selektin-Expression. Als signifikant stellten sich die Unterschiede in den KO Sham-Tieren dar. Durch Melatonin-Applikation wurden die erhöhten Expressionen in den KO-Tieren tendenziell gesenkt; allerdings nicht signifikant (Abb. 16B).

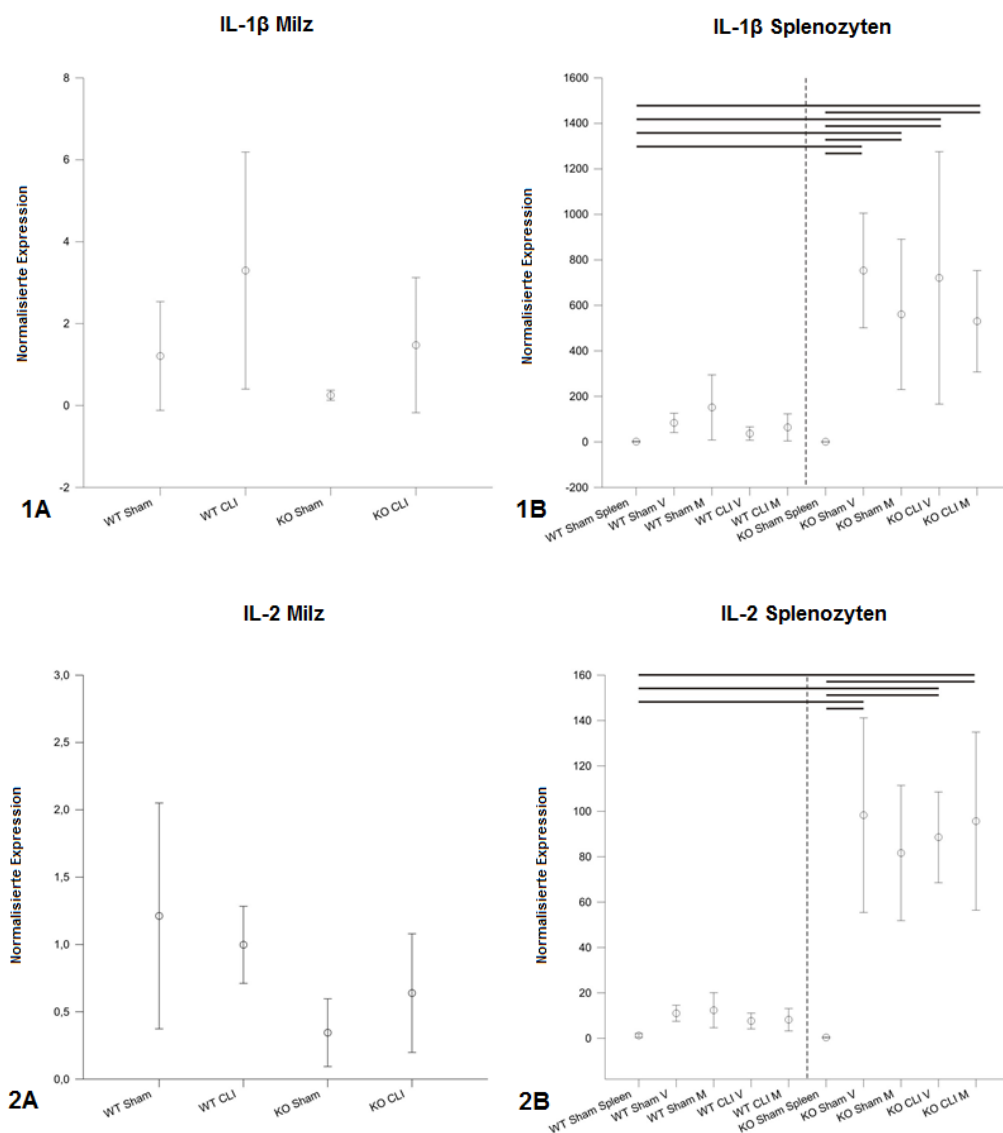


**Abb. 16: Relative Expression von CXCR2 und L-Selektin in den Therapiegruppen**

Normalisierte Expression von CXCR2 (1) und L-Selektin (2) in schockgefrorenem Milzgewebe (A) und isolierten Splenozyten nach 30 Minuten Zellkultur (B). Für jede Gruppe sind MW und SD abgebildet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse und einem sich anschließenden paarweisen Vergleichstest nach Dunn (Signifikanzniveau < 0,05). Der schwarze Balken kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen. V: Vehikel, M: Melatonin.

### 4.5.3 Expressionsanalysen von IL-1 $\beta$ und IL-2

In den Milzen zeigten sich konstant niedrige Expressionen von IL-1 $\beta$  und IL-2 in den Kontrolltieren. Bezüglich IL-1 $\beta$  konnte 1 h nach CLI eine Tendenz zu erhöhter Expression beobachtet werden, welche sich jedoch als nicht signifikant darstellte (Abb. 17A). Nach Kulturnahme fand sich in den KO-, jedoch nicht in den WT-Splenozyten eine deutliche Hochregulation beider Gene, unabhängig von CLI- oder Sham-OP. Diese stellte sich als signifikant gegenüber den beiden Kontrolltier-Gruppen dar. In der Melatonin-Therapiegruppe zeigte sich bei IL-1 $\beta$  eine tendenziell niedrigere Expression in den KO-Tieren (Abb. 17B)

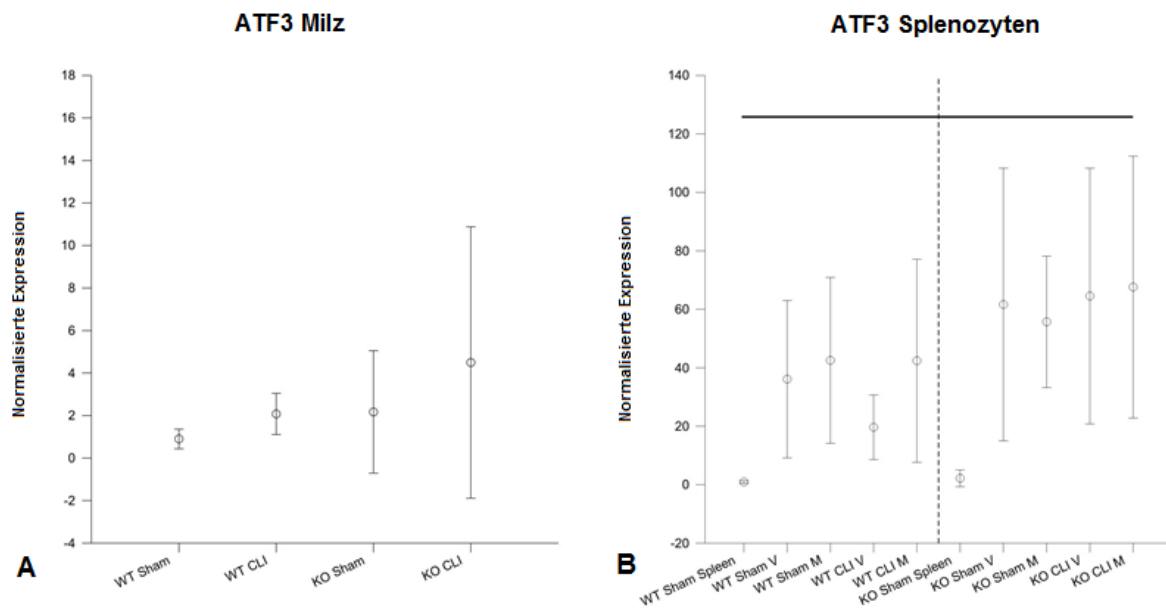


**Abb. 17: Relative Expression von IL-1 $\beta$  und IL-2 in den Therapiegruppen**

Normalisierte Expression von IL-1 $\beta$  (1) und IL-2 (2) in schockgefrorenem Milzgewebe (A) und isolierten Splenozyten nach 30 Minuten Zellkultur (B). Für jede Gruppe sind MW und SD abgebildet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse und einem sich anschließenden paarweisen Vergleichstest nach Dunn (Signifikanzniveau < 0,05). Der schwarze Balken kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen. V: Vehikel, M: Melatonin.

#### 4.5.4 Expressionsanalysen von ATF3

Die Versuchstiere der Kontrollgruppen zeigten eine konstant niedrige Expression von ATF3. Auch nach 1 h CLI zeigten sich keine Änderungen (Abb. 18A). Nach Kulturnahme kam es in allen Gruppen zu einem Anstieg der ATF3-Expression mit der Tendenz zu höheren Werten in den KO-Tieren (Abb. 18B). Signifikante Unterschiede bestanden nur zwischen WT Sham Milz und KO CLI Melatonin. Unterschiede zwischen den unterschiedlichen KO-Gruppen konnten nicht beobachtet werden.



**Abb. 18: Relative Expression von ATF3 in den Therapiegruppen**

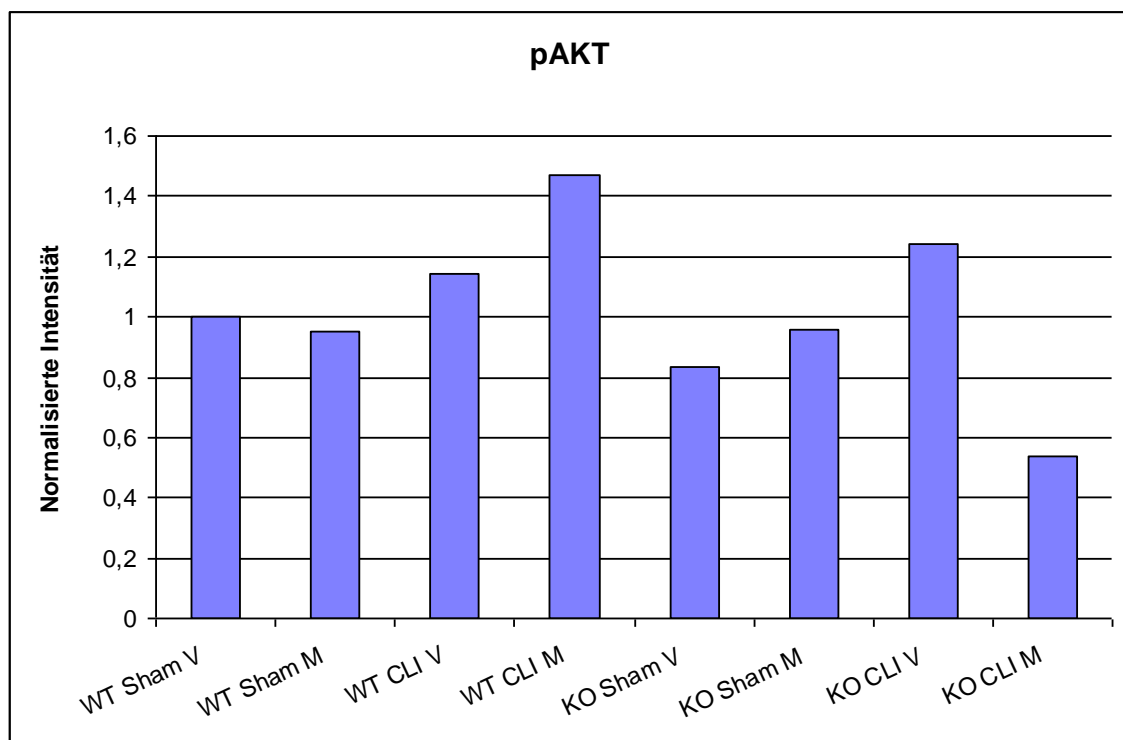
Normalisierte Expression von ATF3 in schockgefrorenem Milzgewebe (A) und isolierten Splenozyten nach 30 Minuten Zellkultur (B). Für jede Gruppe sind MW und SD abgebildet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse und einem sich anschließenden paarweisen Vergleichstest nach Dunn (Signifikanzniveau < 0,05). Der schwarze Balken kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen. V: Vehikel, M: Melatonin.

## 4.6 Western Blot

Mit Hilfe der Immunoblotanalyse wurde die splenische Aktivität der MAP-Kinasen ERK, p38, JNK und der Proteinkinase AKT, sowie deren phosphorylierte Form quantitativ erfasst. Die Ergebnisse der phosphorylierten Proteine wurden, durch Messung des Gesamtproteins im selben Blot, normalisiert. Als Standard verwendeten wir die WT Sham Vehikel-Gruppe und definierten die hier erfasste Menge an Protein als 1.

### 4.6.1 Expression von pAKT

Bei der Analyse der pAKT-Aktivität ergaben sich konstant basale Expressionen in den Tieren welche einer Schein-OP unterzogen wurden (Abb.19). Unabhängig von WT und KO ließ sich in den CLI-Tieren mit Vehikel-Therapie eine um 20% gesteigerte Aktivität von pAKT beobachten. In den WT-Tieren nach CLI verstärkte die Melatonin-behandlung die Aktivität zusätzlich um weitere 30% auf eine insgesamt 1,5fache Intensität des Ausgangswertes. Im Gegensatz hierzu fällt die Aktivität nach Applikation von Melatonin die KO-Splenozyten nach CLI auf das ca. 0,5-fache ab.

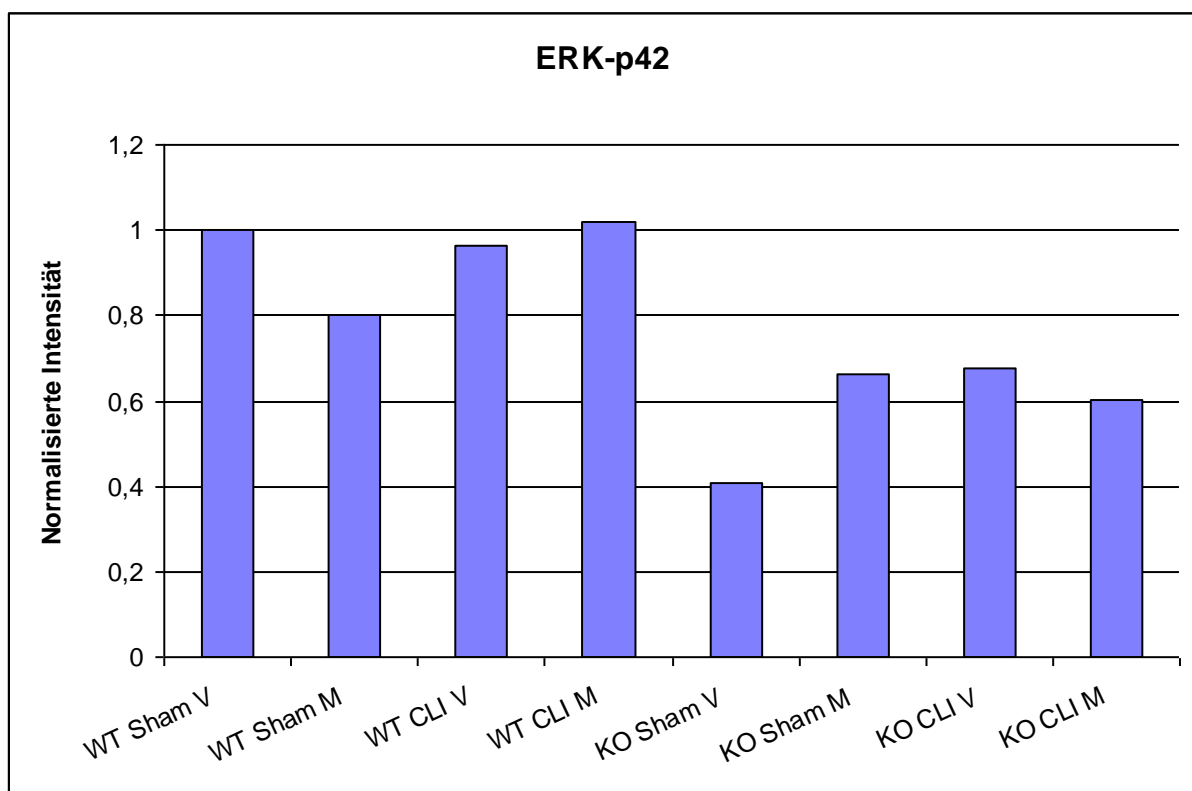


**Abb. 19: Effekt von Melatonin auf die pAKT-Aktivität**

Dargestellt sind die normalisierten Intensitäten von pAKT in Splenozyten nach 30 Min. Zellkultur. V: Vehikel, M: Melatonin.

#### 4.6.2 Expression der ERK-MAPK

Die Intensitäten in den WT-Tieren stellten sich als konstant basal dar (Abb. 20). Lediglich in der WT Sham Melatonin Gruppe konnte eine Tendenz zu um 20% reduzierte Werte beobachtet werden. In Sham-Splenozyten mit defizienten Melatoninrezeptoren stellte sich eine um 60% reduzierte Aktivität der ERK-MAPK dar, welche durch Melatoninapplikation auf 70% der Ausgangswerte erhöht wurde. Auch in den beiden KO CLI Gruppen konnte eine um bis zu 40% reduzierte Aktivität dargestellt werden, welche unabhängig von der Therapie war.



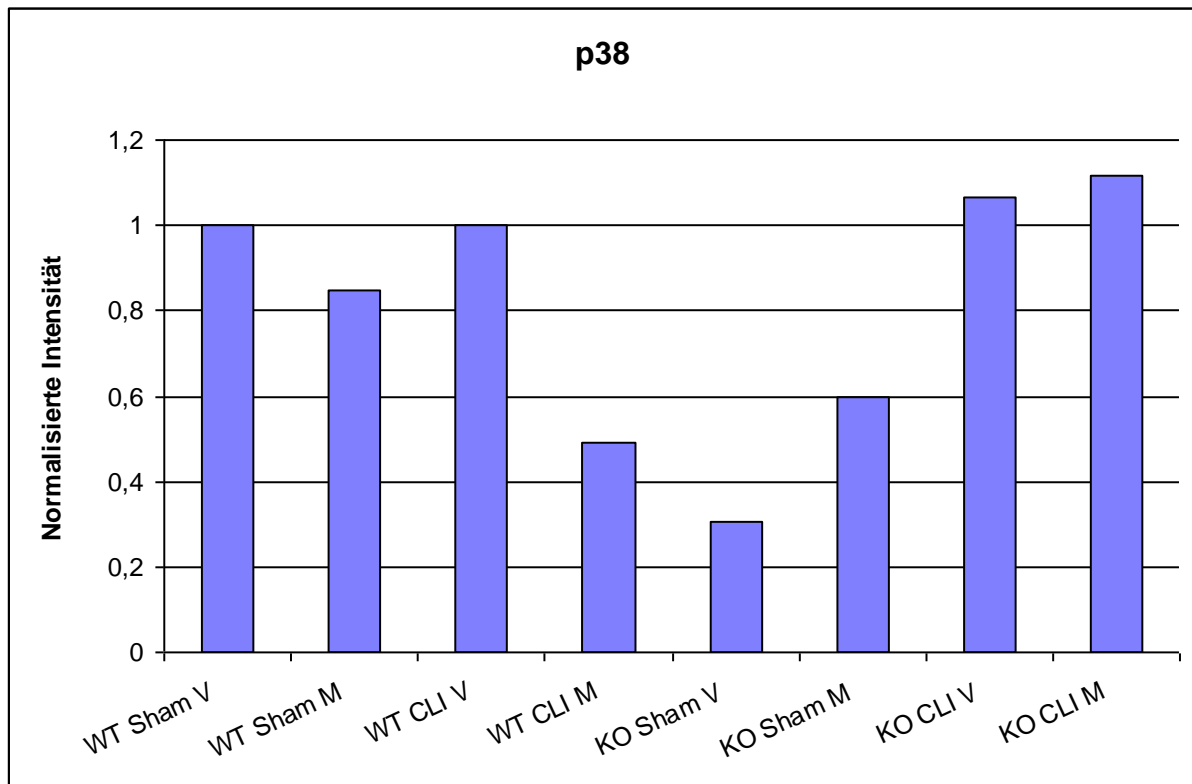
**Abb. 20: Effekt von Melatonin auf die p42-Aktivität**

Dargestellt sind die normalisierten Intensitäten von p42 in Splenozyten nach 30 Min. Zellkultur. V: Vehikel, M: Melatonin.



### 4.6.3 Expression der p38-MAPK

In den WT-Sham und WT CLI-Splenozyten zeigte sich eine konstant basale Aktivität der p38-MAPK (Abb. 21). Diese konnte durch Melatonintherapie in den WT-Sham-Splenozyten um 20% und in den WT-Splenozyten aus CLI-Tieren auf bis zu 50% reduziert werden. In den gepoolten Proben der scheinoperierten Zellen zeigte sich eine im Vergleich zur Referenz deutlich verminderte Aktivität von 30%, welche sich durch Melatonintherapie verdoppelte. In den Melatoninrezeptor-defizienten Splenozyten nach CLI bestand eine, sowohl nach Vehikel- als auch nach Melatonintherapie, basale Intensität der p38-MAPK.

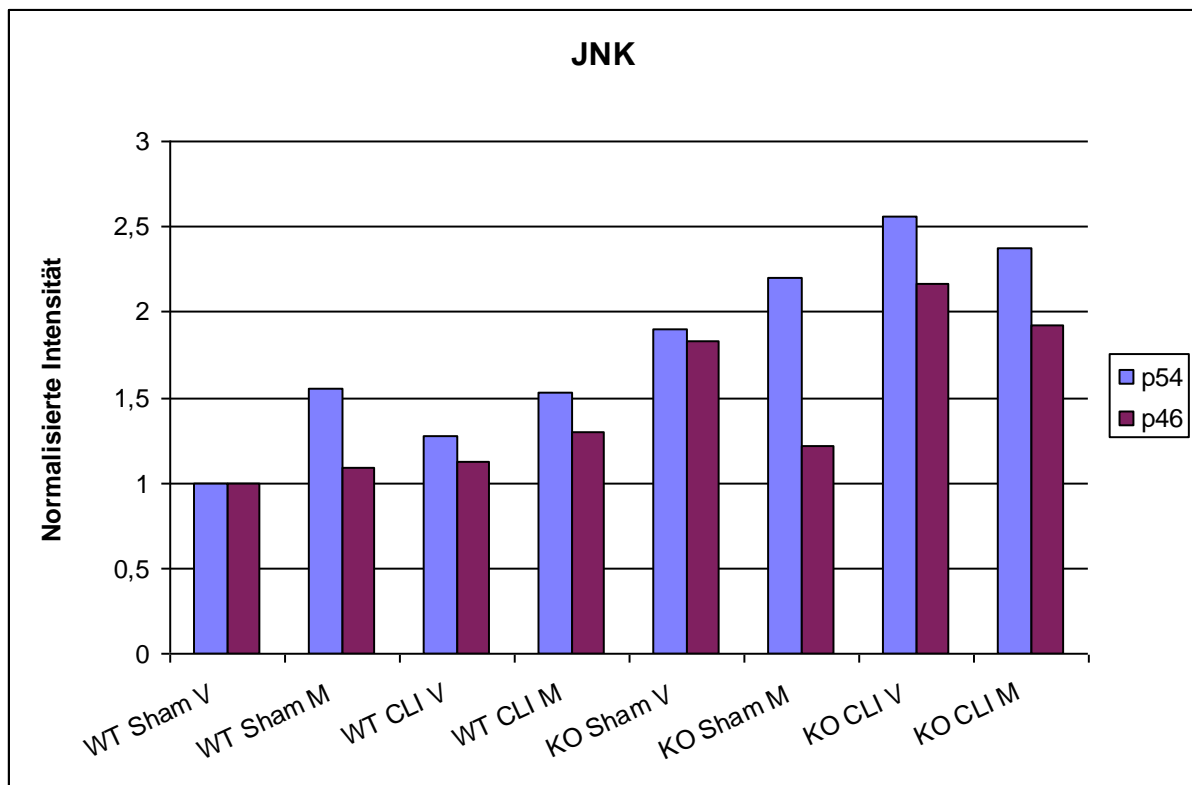


**Abb. 21: Effekt von Melatonin auf die p38-Aktivität**

Dargestellt sind die normalisierten Intensitäten von p-p38 MAPK in Splenozyten nach 30 Min. Zellkultur. V: Vehikel, M: Melatonin.

#### 4.6.4 Expression der JNK-MAPK

Die Analyse der JNK-MAPK ergab konstant basale Aktivitäten in den WT-Milzzellen, unabhängig von Intervention und Therapie (Abb. 22). Demgegenüber konnte in den KO-Mäusen eine bis zu 2-fach höhere Aktivität der JNK-Isoformen p54 und p46 gezeigt werden. Dabei verhielten sich die Isoformen jeweils im gleichen Verhältnis zueinander.



**Abb. 22: Effekt von Melatonin auf die pJNK-Aktivität**

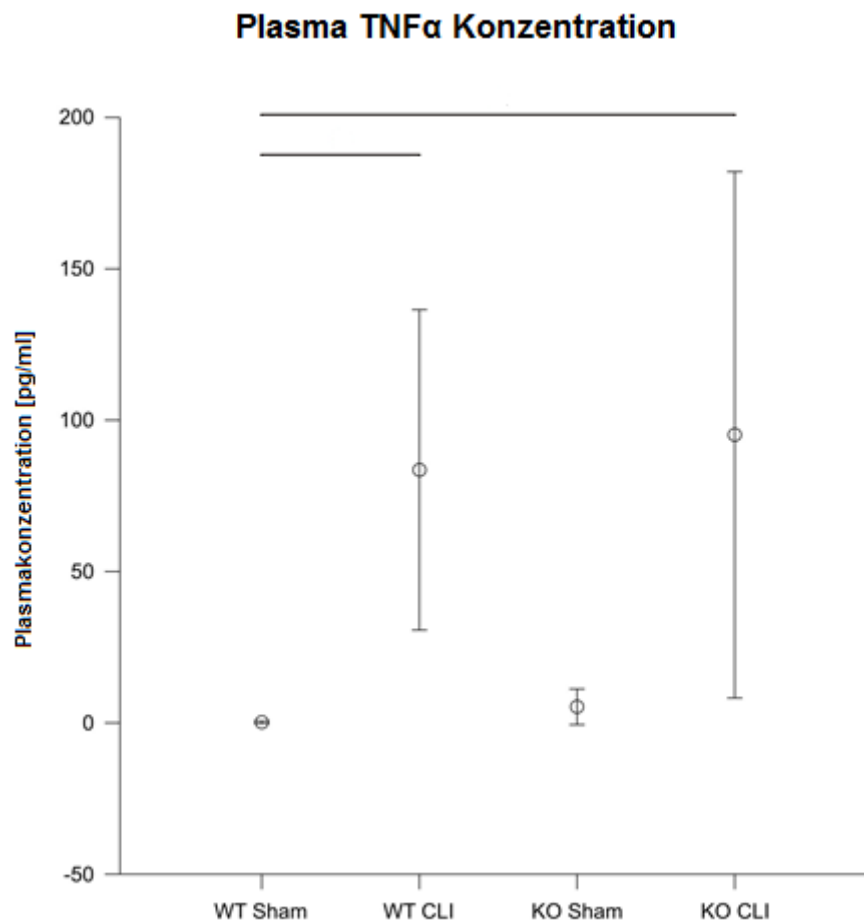
Dargestellt sind die normalisierten Intensitäten von pJNK in Splenozyten nach 30 Min. Zellkultur. V: Vehikel, M: Melatonin.

## 4.7 ELISA

In Abb. 23 sind die durch ELISA-Messungen ermittelten TNF $\alpha$ -Plasmakonzentrationen nach einer Stunde CLI in den unterschiedlichen Versuchsgruppen dargestellt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Scatter Plot als Mittelwert mit Standardabweichung.

In den unstimulierten Proben von WT Sham konnte keine messbare Konzentration von TNF $\alpha$  über der Detektionsgrenze des ELISAs gefunden werden. In der KO Sham Gruppe fanden sich lediglich in drei Proben minimal erhöhte Werte.

Der Anstieg von Plasma-TNF $\alpha$  nach einer Stunde CLI in WT und KO stellte sich als signifikant dar.



**Abb. 23: Plasmakonzentration von TNF $\alpha$**

Dargestellt sind die TNF $\alpha$ -Plasmakonzentration mit MW  $\pm$  SD innerhalb der verschiedenen Therapiegruppen (Milzgewebe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse und einem sich anschließenden paarweisen Vergleichstest nach Dunn (Signifikanzniveau < 0,05). Der schwarze Balken im oberen Teil der Abbildung kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Einfluss von Melatonin auf molekulare Mechanismen, welche durch polymikrobielle Sepsis in Immunzellen der Milz erfolgen, zu untersuchen und die Auswirkungen der Melatoninrezeptoraktivierung auf intrazelluläre Signalwege in Splenozyten zu analysieren. Hierzu wurden sowohl Genexpressionsanalysen als auch Methoden zur Proteinbestimmung (Western Blot, ELISA) angewandt.

### 5.1 Wertung des Modells

#### 5.1.1 Tiermodell

Die vorliegende Studie diente der Analyse der durch CLI induzierten Sepsis im Tiermodell anhand der zellulären Proteinexpression und der Zytokinantwort in Milzzellen, sowie deren Modulierbarkeit durch Melatonin in WT und Knockout-Tieren. Da reine Zell-Kultur-Versuche im Gegensatz zu *in vivo* Modellen keine ausreichende Erfassung von systemischen Einflüssen und komplexen Interaktionen physiologischer und pathophysiologischer Prozesse ermöglichen, wurde in dieser Arbeit das Modell der CLI-Sepsis an der Maus gewählt.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich weibliche C3H/HeN-Mäuse, basierend auf C3H/HeN betrachtet. Diverse Studien konnten in der Vergangenheit zeigen, dass Sexualhormone einen Einfluss auf das Immunsystem haben können. Dabei besteht eine Tendenz zur Immunsuppression durch Androgene und gesteigerte Immunfunktion durch weibliche Sexualhormone [129, 148]. Um den Einfluss von Sexualhormonen daher so gering wie möglich zu halten, wurden in dieser Studie ausschließlich Weibchen verwendet, welche sich in der Metöstrus-Phase und damit in der Zyklusphase mit dem geringsten Östrogen-Plasmalevel befanden. Aufgrund guter Erfahrungen in mehreren Sepsis-Versuchen unserer und anderer Arbeitsgruppen, sowie einer gewährleisteten biologischen Suszeptibilität gegenüber LPS, wurden Tiere des Stamms C3H/HeN verwendet. Da der physiologische Melatoninspiegel tageszeitlichen Schwankungen unterliegt und um eine Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Versuche zum jeweils gleichen Tageszeitpunkt begonnen. Da auch die Östrogenproduktion und die Zyklusphasen der Maus von der zirkadianen Rhythmik beeinflusst werden [133], wurde auch der Vaginalabstrich zu gleichen Uhrzeiten durchgeführt.

Zur Sepsis-Induktion bei Versuchstieren stehen zahlreiche etablierte Methoden mit unterschiedlichem Ansatz zur Verfügung [149]. Bei dem wohl verbreitetsten Modell handelt es sich um das von Wichterman *et al.* beschriebene Verfahren durch coekale Ligatur und Punktion (CLP) [150], welches durch permanenten Stuhlaustritt in das Abdomen und konsekutiver Sepsis charakterisiert ist. Andere Modelle stellen der Colon ascendens Stent (CASP) [151] und das 2009 von Scheiermann *et al.* etablierte Modell der coecalen Ligatur und Inzision (CLI) dar [152]. Als Kritikpunkt bei der CLP-Sepsis wird häufig der langsam fortschreitende Progress des Krankheitsbildes herangeführt, welcher eher die Situation eines intraabdominellen Abszesses als einer akuten Sepsis widerspiegelt. Beim CASP-Modell handelt es sich wiederum eher um die Induktion einer diffusen Peritonitis, mit stetig ansteigenden Zeichen einer systemischen Inflammation. Weiterhin ist der Krankheitsverlauf in beiden Fällen stark abhängig von der Punktions-Größe bzw. dem Stent-Durchmesser. Um ausgehend vom Tiermodell klinisch relevante Aussagen machen zu können, wählten wir das CLI-Modell, da es im Vergleich zur CLP bzw. CASP eher den hämodynamischen und metabolischen Veränderungen der humanen fulminanten Sepsis nahe kommt. Auch im Vergleich zu Modellen mit Endotoxinämie z.B. durch Injektion von LPS weist das CLI-Modell mehrere Vorteile auf. Da es sich um ein polymikrobielles Modell handelt, bei dem mikrobielle Erreger von der Darmflora ausgehend über die Punktionsstelle in die Peritonealhöhle gelangen, führt dies zu einer systemischen Infektion mit Bakteriämie. Entsprechend unterscheidet sich die CLI von diesen Modellen bezüglich des Zytokinprofils. Während die freigesetzten Zytokine im CLI-Modell, ähnlich wie bei septischen Patienten, über mehrere Stunden ansteigen, kommt es im Endotoxin-Modell zu einem unmittelbar, massiven Anstieg proinflammatorischer Zytokine. Daher bietet das CLI-Modell eine viel komplexere Grundlage mit Aktivierung inflammatorischer Mediatoren, wie z.B. die erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle zur Leukozytenrekrutierung [153]. Hinzu kommt, dass Nager im Vergleich zum Menschen relativ Endotoxin-resistent sind und die hämodynamische Antwort dosisabhängig sehr stark variiert [154].

So konnte unsere AG bereits zeigen, dass die CLI-Methode ein geeignetes Modell zur Sepsis-Induktion darstellt, da sie nicht nur alle Kriterien der schweren Sepsis und des septischem Schock erfüllt, sondern auch den zeitlichen Verlauf im

Blutdruckverhalten der Tiere, des Basenüberschusses sowie des pH-Werts und der Sterblichkeit passend darstellt.

### **5.1.2 Melatoninkonzentration und Inkubationszeit**

Um aussagekräftige Daten zu erhalten, sind eine Probengewinnung unter standardisierten Bedingungen sowie eine sorgfältige Wahl der Probenentnahmezeitpunkte essentiell. In der geplanten Studie sollten insbesondere die frühen Reaktionen der angeborenen Immunabwehr untersucht werden. Entsprechend wurden die unbehandelten Tiere bereits 1 Stunde nach Operation getötet und die Milzen in Kultur gegeben. Bisherige Studien zur Therapie mit Melatonin ergaben einen breiten Dosierungsbereich; ein optimaler Dosisbereich konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Aufgrund eines ähnlichen Versuchsaufbaus entschieden wir uns, anlehnend an die Arbeit von Imbesi *et al.* [121], für eine Melatoninindosierung von 1 nM. Diese Konzentration führte außerdem in einer *in vitro* Studie zu einer gesteigerten Stimulation muriner Splenozyten [155]. Sie entspricht weiterhin in etwa der endogenen, physiologischen Melatoninkonzentration bei Maus [156] und Mensch [157]. In den o.g. Untersuchungen von Imbesi *et al.* konnte bereits kurze Zeit nach Behandlung mit niedrig nanomolaren Konzentrationen eine wesentliche Reduktion von pERK und pAKT beobachtet werden, welche sich nach 30 Minuten als signifikant darstellte [121]. Im Gegensatz hierzu waren mikromolare Konzentrationen ineffektiv. Ebenfalls nach 15 – 30 Minuten Inkubation mit Iodomelatonin konnte auch eine maximale Phosphorylierung von JNK beobachtet werden [116]. Anlehnend an diese Ergebnisse orientierten wir uns in dieser Arbeit an o.g. Versuchsführung mit einer Melatoninkonzentration von 1 nM und 30 Minuten Inkubationszeit.

### **5.1.3 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR**

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Untersuchung intrazellulärer Effekte in Splenozyten durch Melatonin dar. Hierfür wurden in einem ersten Teil Veränderungen der Genexpression auf RNA-Ebene nach Melatoninapplikation analysiert.

Bei einer zunehmenden Zahl an Methoden zur Durchführung von Genexpressionsanalysen zählt die qRT-PCR weiterhin zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie, welche sich durch hohe Sensitivität und Spezifität

und einfache Durchführbarkeit auszeichnet. Sie erlaubt den schnellen und empfindlichen Direktnachweis kleinster Mengen von DNA und RNA. Daher hat sich der Einsatz der qRT-PCR inzwischen zu einer weit verbreiteten Methode entwickelt und fast alle Bereiche der Wissenschaft und Medizin als gängiges Instrument der Diagnostik revolutioniert. Entscheidende Vorteile der qRT-PCR gegenüber anderen Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren sind der extrem große dynamische Bereich und der hohe Grad an Verlässlichkeit der Ergebnisse [158], da nicht nur die Produktmenge nach der PCR analysiert wird, sondern die Kinetik der ganzen Reaktion sichtbar wird. Somit ist eine nachträgliche, externe Analyse der PCR-Produkte mit erneutem Öffnen der Reaktionsgefäße nicht mehr notwendig. Dies mindert die Gefahr von Kontaminationen der Arbeitsplätze mit PCR-Produkten erheblich. Trotz zunehmender Beliebtheit alternativer Methoden zur Genexpressionsanalyse, wie Sequenz-basierten Methoden (SAGE) und der DNA-Microarray Technik, mit teilweise exakteren mathematischen Auswertungsmodellen, hoher Durchsatzrate und der Erhebung großer Mengen an Sequenzdaten, fehlt diesen Methoden meist die hohe quantitative Genauigkeit der qPCR.

Mögliche Fehlerquellen der qRT-PCR stellen eine fehlerhafte Analyse der PCR-Daten mit unkritischer Auswahl der Referenzgene, fehlender Effizienzkorrektur und unpassender bzw. falscher Statistik dar. Dies führt zu einer signifikanten Verzerrung der Ergebnisse und damit zu einer falschen quantitativen Aussage und eingeschränkter Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Forschungsgruppen [159]. Daher wurden 2009 die MIQE-Richtlinien von Bustin *et al.* ins Leben gerufen, um einen akkuraten und zuverlässigen Qualitätsstandard für die Durchführung, Datenanalyse und die Publikation von PCR-Daten zu etablieren und damit die Reliabilität und Validität der publizierten Methodik zu gewährleisten bzw. die Richtigkeit der Ergebnisse in der wissenschaftlichen Literatur zu steigern [159]. In Anlehnung an diese Richtlinien erfolgten die Entscheidung der Methodik, die Durchführung der Experimente sowie die Ergebnispräsentation der vorliegenden Arbeit.

Auch im Rahmen der Auswertung der erhobenen Rohdaten stehen verschiedene etablierte Modelle zur Verfügung. In unserem Fall kam zur Cq-Wert-Determinierung das Modell der Bestimmung mittels nicht-linearer Regression nach der Richardson-Funktion zur Anwendung. Andere Methoden funktionieren über eine Bestimmung des

Ct-Wertes (Beginn des exponentiellen Wachstums der Fluoreszenzkurve entsprechend eines Schwellenwertes) oder Cp-Wertes (Bestimmung über die zweite Ableitung der Fluoreszenzkurve). Guescini *et al.* zeigten jedoch dass die sog. Cy<sub>0</sub>-Methode mittels Cq-Bestimmung den klassischen Methoden überlegen ist [142], weshalb sie auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam.

Zur PCR-Effizienzkorrektur stehen ebenfalls unterschiedliche Methoden zur Berechnung zu Verfügung. Klassischerweise wird die Berechnung des relativen Expressionsunterschieds über die  $\Delta\Delta Cq$ -Methode nach Livak und Schmittgen durchgeführt [143]. Hierbei wird in zwei Schritten erst die Expression des Zielgens mittels derer eines internen Referenzgens normalisiert und anschließend die normalisierten Expressionsunterschiede der Behandlungsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen [143]. Der relative Unterschied berechnet sich schließlich nach der Formel:  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  [143]. Entsprechend dem experimentellem Design wurde anschließend zur Analyse der gewonnenen Daten eine einfaktorielle Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis durchgeführt (s. 3.2.4.2). In dieser Arbeit entsprachen die Vorgaben zur Auswertung dem  $\Delta\Delta Cq$ -Modell nach Livak und Schmittgen.

#### **5.1.4 Proteinanalytik mittels Western Blot**

Zur quantitativen Proteinbestimmung stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, welche sich in drei Hauptklassen einteilen lassen: direkte Messung der UV-Absorption von Proteinen, kolorimetrische Methoden und quantitative Aminosäureanalyse. Trotz einer ganzen Reihe von etablierten Methoden, besitzt jede ihre spezifischen Vor- und Nachteile. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Bradford Assay, die mit Abstand populärste Methode zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen, gewählt [144]. Der Bradford-Test zeichnet sich durch eine einfache Durchführbarkeit mit hoher Sensitivität bei geeigneter Standardwahl aus. Weitere Vorteile stellen der Nachweis bereits geringster Proteinmengen von wenigen µg, die rasche Farbentwicklung und die geringe Variabilität der Färbung zwischen verschiedenen Proteinen dar. Somit können durch gleichmäßige Probenbeladung Veränderungen in der Menge des gewünschten Proteins, die z.B. durch unterschiedliche Behandlung der eingesetzten Zellen auftreten können, direkt erkannt werden.

Die Analyse und Isolierung spezifischer Proteine basiert heute vor allem auf detaillierten molekularen Kenntnissen der strukturellen und funktionalen



Charakteristika, welche durch unterschiedliche elektrophoretische, chromatographische und immunologische Techniken genutzt werden. In unserem Fall wählten wir die Western-Blot-Analyse [160], welche als anerkanntes und bewährtes Verfahren, v.a. zur qualitativen Untersuchung und Identifizierung von Proteinen, gilt [161]. Im Gegensatz zu Methoden, die mRNA nachweisen, wird durch dieses Verfahren das entsprechende Protein selbst nachgewiesen. Der Nachweis von mRNA stellt zwar die sensitivere Methode dar, allerdings kann mit ihr nicht bestätigt werden, ob das gewünschte Protein auch tatsächlich synthetisiert wurde. Wesentlicher Vorteil des Western Blots gegenüber anderen Nachweisverfahren stellt die hohe Spezifität dar [162]. Die Auftrennung der Proteine nach Größe und Ladung ermöglicht eine Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Reaktionen der Antikörper. Weiterhin erlaubt diese Methode eine mögliche Quantifizierung des Signals durch Vergleich mit einem internen Mengenstandard, so dass Reaktionen der Zelle auf unterschiedliche Bedingungen sowohl optisch als auch rechnerisch erfasst werden können.

### **5.1.5 Zytokin-Nachweis mittels ELISA**

Nach Entnahme der Blutproben wurden diese unverzüglich auf Eis verbracht und anschließend verarbeitet. Dadurch konnte eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch lagerungsbedingte Einflüsse ausgeschlossen werden.

Die Methode des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) stellt das wohl am häufigsten verwendete Verfahren zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Zytokinen im klinischen und experimentellem Bereich dar [147]. In unserem Fall wurde zur Analyse ein spezifisches, kommerziell erhältliches ELISA-Kit verwendet. Insbesondere für die Untersuchung von Serum bietet die ELISA-Technik den Vorteil mehrere verschiedene Antigene und Antikörper nachweisen zu können. Daher bietet sich diese Nachweisform für Screening-Untersuchungen im Rahmen der Sepsisdetektion an. Hiermit gelingt eine Momentaufnahme des laborchemischen Gesamtzustandes des Patienten. Prinzipiell können zwei ELISA-Techniken unterschieden werden: der Sandwich-ELISA und der kompetitive ELISA. Vorteil des Sandwich-ELISAs stellt dessen höhere Spezifität im Vergleich zum kompetitiven ELISA dar, da die zur Detektion verwendeten Antikörper gegen mindestens zwei verschiedene Epitope des Analyten gerichtet sind. Da auf Trennmethoden zur Separierung freier und gebundener Antigene verzichtet werden kann, steht neben

dem kostengünstigen Aspekt die einfache Durchführung und die schnelle Quantifizierung durch photometrische Messung im Vordergrund. Neben einer hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und enorm hohem Probendurchsatz durch die Verwendung von 96-Loch Mikrotiterplatten zeichnet sich diese Methode außerdem durch eine Nachweisgrenze von wenigen Picogramm aus. Dieses Analyseverfahren umgeht das Problem der Spezifität biologischer Zytokinmessverfahren, da unterschiedliche Zytokine prinzipiell vergleichbare Zellreaktionen auslösen können. Andererseits werden im ELISA jedoch auch immunreaktive Zytokine erfasst, welche nicht zwingend biologisch aktiv sind.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Sepsis-Untersuchung**

Für die Diagnosestellung der Sepsis spielt der Nachweis einer Infektion eine entscheidende Rolle. Ferner ist die Erregeridentifikation essentiell für eine adäquate Therapie. Jedoch ist ein Bakteriämie-Nachweis nur in ca. 30% der klinisch an Sepsis erkrankten Patienten zu erbringen [163]. Dennoch orientierten wir uns im Rahmen dieser Arbeit an den allgemein gültigen S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. [7]. Aufgrund des fehlenden Wachstums in den Blutkulturen konnte keine Bakteriämie nachgewiesen werden. Durch eine kontrollierte Narkoseführung und ständige Temperaturüberwachung wurden die Kreislaufparameter und Körpertemperatur während des Beobachtungszeitraumes durchgehend konstant gehalten. Daher konnten keine klinischen Kriterien zum Nachweis einer Infektion herangezogen werden und somit die vereinheitlichten Sepsiskriterien nicht erfüllt werden.

Grundvoraussetzung für die Aussagefähigkeit und damit den Vergleich der systemischen Inflammation in beiden Tiergruppen stellt eine identische bakterielle Normalflora des Darmes dar, da nur so von gleichen Reizen und somit Abwehrreaktionen des Immunsystems ausgegangen werden kann. Betrachtet man die durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen der Peritoneallavage nach CLI, so ergaben sich deutliche Unterschiede in der quantitativen, als auch qualitativen Auswertung. Als Beweis für eine korrekt durchgeführte CLI mit Austritt von Fäzes in die Peritonealhöhle konnte in allen Sepsis-Tieren ein deutliches Wachstum von Bakterienkolonien nachgewiesen werden, während in den Sham-

Tieren kein Wachstum zu verzeichnen war. Allerdings unterschied sich das Wachstumsmuster auch zwischen beiden Sepsis-Gruppen. So konnte in den WT-Tieren neben einem einheitlichen Wachstum von Enterokokken auch die typische Wachstumsmorphologie von *Proteus spp.* nachgewiesen werden. In der Peritonealflüssigkeit der KO-Tiere fand sich entsprechender Keim nicht. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass der  $MT_1^{-/-}/MT_2^{-/-}$ -Knockout womöglich entscheidende Auswirkung auf die Abwehr von Bakterien hat. Ein vermehrtes Auftreten dieser Keime könnte allerdings auch in Zusammenhang mit der Ernährung stehen. Da die WT-Tiere von extern bezogen wurden, kann daher eine primäre Kolonisation durch unterschiedliche Behandlung nicht ausgeschlossen werden.

Weiteres Kriterium für den Nachweis einer systemischen Inflammation stellt die Leukozyten-Zahl im peripheren Blut dar. In der vorliegenden Arbeit konnte in allen Versuchsgruppen ein deutlicher Abfall der Leukozyten über die Zeit beobachtet werden, welcher unabhängig von der Therapie zu sein scheint. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in der Vergangenheit beobachtet. So konnten Dhabhar *et al.* zeigen, dass akuter Stress unmittelbar zu einer reversiblen Umverteilung von Leukozyten aus dem Blut in andere Kompartimente führt [164]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch im Rahmen großer chirurgischer Eingriffe beobachtet [165, 166]. Dabei bezieht sich der Begriff der Stressantwort auf endokrinologische und metabolische Veränderungen unabhängig von der auslösenden Ursache. So kann durch ein chirurgisches Trauma regelmäßig ein Anstieg des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) und Adrenokortikotropin (ACTH) mit konsekutiv gesteigerter Ausschüttung von Katecholaminen und Glukokortikoiden im Rahmen einer verstärkten Tätigkeit der Hypothalamo-Hypophysären-Achse (HHA) gemessen werden [167]. Diese stressbedingte Umverteilung immunkompetenter Zellen aus dem peripheren Blut in andere Immunkompartimente wird durch eine veränderte Barrierefunktion ermöglicht und könnte somit, zum Schutz vor eindringenden Erregern, am ehesten einen physiologischen Bestandteil der Stressbewältigung darstellen. Somit ist der regelmäßige Leukozytenabfall in allen Gruppen eher auf die einheitliche Operation statt auf eine womöglich induzierte Sepsis zurückzuführen.

Die chirurgische Stressantwort bezeichnet die Gesamtheit der durch das Wundtrauma verursachten Modulationen, die eine Vielzahl von endokrinologischen, hämatologischen und immunologischen Veränderungen umfassen [167]. So entsteht

neben den bereits beschriebenen hormonellen Veränderungen innerhalb der Wunde eine Inflammation, welche sich durch den primären Inflammationsmediator TNF- $\alpha$  sowohl im lokalen Bereich der Wunde als auch in der systemischen Zirkulation nachweisen lässt [168]. Einerseits stellt somit bereits das chirurgische Gewebetrauma an sich einen begünstigenden Faktor für die Entwicklung eines SIRS dar, andererseits führt die massive Endotoxin-Einschwemmung aus dem Gastrointestinaltrakt, sowie die Ischämie des Coecums, zu einem komplexen Zusammenspiel, welche ein SIRS induzieren.

TNF- $\alpha$  besitzt viele wichtige Funktionen in der Pathogenese entzündlicher Prozesse innerhalb des Körpers und wird als einer der Initiatoren des Entzündungsgeschehens angesehen, welcher die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren initiiert. So konnte TNF- $\alpha$  als erstes Zytokin nach LPS-Injektion in der Blutbahn [169], mit einem Maximum nach 1,5 Std. [170], nachgewiesen werden. Weiterhin wirkt TNF- $\alpha$  nicht nur als Initiator, sondern hält auch die Produktion weiterer proinflammatorischer Mediatoren aufrecht. So induziert es beispielsweise durch Hochregulation verschiedenster Adhäsionsmoleküle die Leukozytendiapedese und eine zunehmende Gefäßpermeabilität [171]. In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration in den Sepsis-Tieren beobachtet werden. Zwischen den WT- und KO-Tieren bestand jedoch kein Unterschied. Da sich die Therapie beider Tiergruppen nur durch die CLI unterschied, kann die Standardpräparation somit als Ursache für den systemischen Zytokinanstieg ausgeschlossen werden. Diese Beobachtung lässt somit Rückschlüsse auf eine korrekt durchgeführte CLI mit nachfolgender systemischer Inflammation zu. Weiterhin scheint der Melatonin-Knockout prinzipiell keinen entscheidenden Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Produktion im Serum zu haben. Dennoch gestaltet sich der alleinige Nachweis von TNF- $\alpha$ -Serumspiegeln zur Sepsisprädiktion in der klinischen Routine aufgrund der relativ kurzen biologischen Halbwertszeit als problematisch und eingeschränkt beurteilbar [172].

### 5.2.2 Genexpressionsanalysen

Im Rahmen der Sepsisforschung beschäftigt sich unsere AG u. a. mit den Effekten des Pinealhormons auf die Organprotektion im Tiermodell. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Untersuchung der Änderungen intrazellulärer Signalwege nach Melatoninrezeptoraktivierung, die mit den Melatonin-induzierten immunoprotektiven Effekten in Zusammenhang stehen könnten. Ziel des ersten Versuchsabschnittes war es, den Einfluss einer Melatonintherapie sowie die Aktivierung der membranständigen Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 auf die Genexpression inflammatorischer Mediatoren nach polymikrobieller Sepsis in Milzzellen von Mäusen zu untersuchen.

Endothelzellaktivierung und Leukozyten-Endothel-Interaktion entsprechen den grundlegenden Mechanismen der Inflammation. Dabei stellt die Extravasation und transendotheliale Migration von im Blut zirkulierenden Leukozyten an den Ort der Entzündung das eigentliche Schlüsselereignis der inflammatorischen Antwort dar. Die Kommunikation von Endothel und Immunzellen wird durch endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle, welche nach Zytokin-Stimuli auf der Zelloberfläche exprimiert werden, reguliert. Neben ihrer Hochregulation bei Infektionen und Sepsis werden Adhäsionsmoleküle auch bei Trauma, chronischen Entzündungen und Reperfusionssyndromen im Rahmen der inflammatorischen Antwort auf Leukozyten und Endothelzellen verstärkt exprimiert. Entsprechend der Adhäsionskaskade wird der initiale Kontakt der Leukozyten mit Endothelzellen und anschließendem Entlangrollen an der Endotheloberfläche zur Extravasation in das Entzündungsgebiet durch Selektine reguliert. Im nächsten Schritt kommt es schließlich durch Vermittlung der Integrin-Liganden der Immunglobulin-Superfamilie (z.B. ICAM-1) zum festen Anhaften der Immunzellen an das Endothel mit anschließender Diapedese. Diese Leukozytenadhäsion, als initialer Schritt der natürlichen Immunabwehr des Organismus, korreliert dabei mit dem Ausmaß der Leukozytenaktivierung im Rahmen von systemischer Inflammation und Sepsis [173]. Die dadurch entstehende schwere Schädigung des endothelialen Zellverbandes in der Frühphase der Inflammation ist somit mitverantwortlich für den Verlust der Barrierefunktion und führt durch das *capillary leakage* zur Extravasation von Plasmawasser und Eiweißverlust [173].

### 5.2.2.1 Expressionsanalysen von TNF $\alpha$ , CXCL2 und ICAM-1

Die Expressionen von TNF $\alpha$ , CXCL2 und ICAM-1 zeigten ähnliche Veränderungen und werden daher nachfolgend zusammen besprochen.

Nach 1 h CLI zeigten sich in allen Milzproben konstant niedrige Werte mit Tendenz zu leicht erhöhten Expressionen in den Sepsis-Tieren. Diese stellten sich jedoch als nicht signifikant dar. Da zwischen WT- und KO-Tieren gleicher Therapie kein Unterschied zu beobachten war, kann ein möglicher Einfluss des Knockouts auf die initiale Entwicklung der Inflammation *in vivo* in der ersten Stunde größtenteils ausgeschlossen werden. Während der Kulturnahme konnte weiterhin ein leichter Anstieg in allen Gruppen beobachtet werden. Besonders deutlich zeigten sich die Veränderungen in den KO-Tieren nach Sepsisinduktion. So konnte in den MT-Rezeptor-defizienten Tieren nach CLI signifikant erhöhte Expressionslevel aller drei zu untersuchenden Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle dargestellt werden. Weiterhin schienen die Expressionen in den KO-Tieren durch Inkubation mit Melatonin andeutungsweise leicht gesenkt. Diese Wirkung könnte über antioxidative Wirkungen von Melatonin vermittelt sein. Übereinstimmend mit bereits veröffentlichten Arbeiten scheint Melatonin somit die Genexpression von TNF $\alpha$  [88, 174] und ICAM-1 in der akuten Entzündungsreaktion zu hemmen [175]. In vorhergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte ebenfalls durch exogene Melatoninapplikation ein induzierter Expressionsanstieg von CXCL2 nach hämorrhagischem Schock reduziert werden (Publikation in Vorbereitung). Diese Ergebnisse legen einen möglichen Einfluss des Knockouts auf die Immunabwehr in der frühen Phase der systemischen Inflammation nahe, was sich in einer verringerten Inhibition proinflammatorischer Zytokine äußert. Da in der WT CLI Gruppe keine Veränderung in der Expression vorhanden ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass es sich in diesem Falle viel mehr um eine Rezeptor-vermittelte statt antioxidative Wirkung von Melatonin handelt. Protektive Effekte von Melatonin in der akuten Inflammation konnten bisher nur in hohen pharmakologischen Konzentrationen des Melatonins registriert werden [89, 110]. Diese Effekte lassen sich am ehesten über antioxidative Eigenschaften erklären. Unsere Ergebnisse, ähnlich wie die von *Gallatin et al.* [176], deuten jedoch darauf hin, dass die Wirkung endogener Konzentrationen in der akuten Entzündungsreaktion vielmehr über die Aktivierung membranständiger Melatoninrezeptoren vermittelt wird. So führte die Aktivierung von

Melatoninrezeptoren in physiologischen Dosen sowohl zu einer Hemmung des Leukozytenrollens als auch der Adhäsion, während höhere Konzentrationen keinen Effekt zeigten [177].

Aufgrund der wichtigen Funktion der untersuchten Zytokine in der Diapedese lassen sich diese Ergebnisse am ehesten als eine Rezeptor-vermittelte Hemmung der Leukozyten-Extravasation interpretieren, welche in KO-Tieren versagt. Aufgrund gleicher Genexpressionsmuster der untersuchten Moleküle liegt die Vermutung einer ähnlichen Regulation bzw. Modulation durch interagierende Signalwege nahe.

### 5.2.2.2 Expressionsanalysen von CXCR2 und L-Selektin

Die Expressionen von CXCR2 und L-Selektin zeigten ähnliche Veränderungen und werden daher zusammen besprochen.

1 h nach CLI zeigten sich in allen Milzproben konstant niedrige Werte mit tendenziell erniedrigten Expressionen von CXCR2 und L-Selektin in den Sepsis-Tieren. Somit kann eine alleinige Induktion durch die Operation oder Kulturnahme ausgeschlossen werden. Keine dieser Änderungen stellte sich jedoch als signifikant dar. Auch nach 30 Minuten Inkubation konnte in den WT-Tieren keine Änderung in der Expression beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu fanden sich jedoch deutlich erhöhte Werte in allen KO-Splenozyten, sowohl in den Sham- als auch in den Sepsis-Tieren. Dies lässt auf einen generellen Einfluss des Melatonin-Knockouts auf die Expression von CXCR2 und L-Selektin schließen. Interessanterweise fanden sich hierbei höhere Expressionen in den KO Sham-Splenozyten im Vergleich zu den KO Sepsis-Splenozyten. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit denen welche Rose *et al.* als Liganden-induzierte Internalisierung von CXCR2 beschrieb [178]. Dabei führt die exzessive Aktivierung des G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptors durch Chemokine zu einer vermehrten Endozytose mit Sensitivitätsverlust der Zelle gegenüber verschiedenster Reize [179] und damit zur abgeschwächten Chemotaxis CXCR2-exprimierender Zellen [180]. Gleiche Ergebnisse zeigten sich für L-Selektin. Diese Beobachtung könnte sich mit dem Vorgang des *Sheddings* erklären lassen. Neben seiner mechanischen Vermittlerfunktion besitzt L-Selektin über seinen cytoplasmatischen Teil auch die Fähigkeit zur Signaltransduktion [181] über eine Aktivierung von MAPK [182]. So wird L-Selektin nach Aktivierung durch Abspaltung von der Zelloberfläche rasch herunterreguliert [183]. Die genaue physiologische Funktion der löslichen Form des L-Selektins (sL-Selektin) ist bisher nicht bekannt. Da

es jedoch in hohen Konzentrationen in der Lage ist, die Leukozytenadhäsion am Endothel zu inhibieren, geht man davon aus, dass es als kompetitiver Regulator der Leukozyten-Endothel-Interaktion dienen könnte [183]. Weiterhin konnte man in den KO-Melatoningruppen beider zu untersuchender Rezeptoren einen Trend zur Beeinflussung der Expression in Richtung physiologischer Werte vermuten. Allerdings entwickelte sich die Expression von L-Selektin in der KO-CLI-Gruppe unter Melatonintherapie wieder gegenläufig in Richtung der Werte der Vehikel-Gruppe. Eventuell liegt hier ein großer interindividueller Unterschied aufgrund unterschiedlichen Ansprechens der Tiere vor, so dass eine pauschale Beurteilbarkeit des Effektes fraglich ist. Möglicherweise könnte Melatonin jedoch eine protektive, antiinflammatorische Wirkung über eine Herunterregulation von CXCR2 und L-Selektin zukommen. Entsprechend beschrieben Recchioni *et al.*, dass die Melatoninapplikation in aktivierten Leukozyten ein *Shedding* von L-Selektin komplett verhindern konnte [184]. Aufgrund des Knockouts könnte die Wirkung am ehesten über antioxidative Effekte oder durch Aktivierung nukleärer Rezeptoren vermittelt sein.

### 5.2.2.3 Expressionsanalysen von IL-1 $\beta$ und IL-2

Da die Expressionen von IL-1 $\beta$  und IL-2 ähnliche Veränderungen in den Genexpressionen zeigten, werden sie daher im Folgenden gemeinsam besprochen.

Nach 1 h zeigten sich in allen Milzproben basal niedrige Level von IL-1 $\beta$  mit Tendenz zu leicht erhöhten Werten in den Sepsis-Tieren. Dabei konnte kein Unterschied zwischen WT und KO beobachtet werden. Diese leicht erhöhten Expressionen lassen sich somit a. e. als Reaktion auf die systemische Inflammation durch CLI interpretieren. Die Änderungen stellten sich jedoch als nicht signifikant dar. Somit scheint der Knockout an sich primär keine Auswirkung auf die initiale Entwicklung der Entzündung *in vivo* zu haben und die Initiierung in WT und KO gleich zu sein. Nach 30 Minuten Inkubation zeigten die Expressionen in den WT-Tieren keine Veränderungen. Es bestanden weiterhin basale Werte, welche sich auch nach Melatoninapplikation nicht änderten. Im Gegensatz hierzu kam es zu deutlichen Veränderungen in den KO-Tieren. So stiegen die IL-1 $\beta$ -Expressionen im Vergleich zu den Ausgangswerten in allen KO-Gruppen signifikant an. Auffallend hierbei war die Beobachtung, dass die Werte in KO Sham und Sepsis-Tieren gleich anstiegen. Somit



scheint die Induktion von IL-1 $\beta$  nicht Sepsis-induziert zu sein und der Knockout prinzipiellen Einfluss auf die Entwicklung der Inflammation *in vitro* zu haben. Da dieser Expressionsanstieg erst nach 30-minütiger Inkubation auftrat, könnte eine mögliche Erklärung hierfür in der Zellkultur und der Inkubationsdauer liegen. So könnte eine primär durch endogenes Melatonin erfolgte Aktivierung von MT-Rezeptoren in WT-Tieren eine protektive Wirkung auf die Zellkultur-induzierte Stressreaktion bewirken. In KO's würde diese Schutzfunktion entfallen und somit zu einem Anstieg des zentralen Entzündungsmediators führen. Einen weiteren wichtigen Punkt könnte der Zeitpunkt der Tötung der Tiere darstellen. Da in unseren Blutkulturen kein Nachweis einer Bakteriämie gestellt werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass der Zeitpunkt für einen signifikanten Unterschied zwischen Sham und Sepsis zu früh gewählt wurde.

Nach Melatoninapplikation konnte diese verstärkte Genexpression, sowohl in den Sham als auch in den Sepsis-Splenozyten, tendenziell in Richtung basale Werte gesenkt werden. Aufgrund des Knockouts muss eine rezeptorvermittelte Wirkung ausgeschlossen werden; die Effekte sind möglicherweise durch antioxidative Effekte erklärbar. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits durch Wu *et al.* in Ratten gezeigt [90]. Allerdings liegen auch zahlreiche gegenteilige Ergebnisse vor, die eine Induktion von IL-1 $\beta$  durch Melatonin beschreiben [72, 185]. Möglicherweise könnte dies in höheren Melatoninkonzentrationen und unterschiedlichen Versuchsansätzen begründet sein. So konnten teils gegensätzliche Wirkungen von Melatonin in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen beobachtet werden. Diese kontroverse Datenlage zu IL-1 $\beta$  wirft die Frage auf, ob seine Funktion überhaupt isoliert betrachtet werden darf.

Ähnliche Veränderungen in der Expression konnten auch für IL-2 beobachtet werden. So wurden auch hier nach 1 h CLI durchgehend basale Werte in den Milzzellen festgestellt. Ein Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht. Auch nach Inkubation blieben diese Expressionswerte in den Wildtypen unverändert. Auf einen möglichen Einfluss von Melatonin gab es keine Hinweise. Entsprechend den Veränderungen in IL-1 $\beta$  kam es in den KO-Splenozyten zu einem signifikanten Anstieg von IL-2 in allen Gruppen, unabhängig von Intervention und Therapie. Allerdings ergab sich auch hier, trotz vorhandener Evidenz [105], kein Anhalt für einen Einfluss der Melatoninverabreichung. Entsprechend muss auch im Fall von IL-

2 ein möglicher Einfluss des Knockouts als sehr wahrscheinlich diskutiert werden. Mögliche Erklärungen entsprechen denen von IL-1 $\beta$ . Neben diesen Ergebnissen, liegen auch Daten vor, die eine Rolle von IL-2 im pathophysiologischen Geschehen der Sepsis postulieren. So zeigten mehrere Arbeiten, dass IL-2 eine wichtige Rolle in der Förderung der T-Zell-Proliferation und in der Regulation verschiedenster Gene in der systemischen Entzündungsreaktion zukommt [186]. In Bezug auf Melatonin wurde in zahlreichen Studien übereinstimmend eine rezeptorvermittelte Aktivierung der IL-2-Produktion in der Inflammation dargelegt [74, 185]. Diese Ergebnisse konnten im vorliegenden Untersuchungsmodell allerdings nicht bestätigt werden. Als mögliche Ursache könnte auch hier der zeitliche Faktor gesehen werden.

#### **5.2.2.4 Expressionsanalysen von ATF3**

In den schockgefrorenen Milzen zeigten sich 1 h nach CLI recht konstante Expressionen von ATF3, mit Tendenz zu leicht erhöhten Werten in den KO-Tieren. Auffallend waren die unterschiedlichen Standardabweichungen (SD). Während die SD in beiden WT-Gruppen sehr gering ausfielen kam es in der KO Sham- bis zur KO Sepsis-Gruppe zu einer deutlichen Zunahme. Möglicherweise liegen hier interindividuelle Unterschiede in der Reaktion des Immunsystems der Einzeltiere vor. Der Transkriptionsfaktor ATF3 gilt als stressinduzierter Faktor [187], bzw. als Teil der „adaptiven Antwort“ auf intra- und extrazelluläre Veränderungen [187]. Induziert wird über verschiedene Stimuli, wie Stresssignale [188] und mechanische Beeinflussung [189]. So könnte die Operation, als Stressfaktor an sich, Ursache für diese Veränderung sein. Dementsprechend könnte der Knockout zusätzlich zu einer Verstärkung der Inflammation beitragen. Es muss jedoch beachtet werden, dass es sich in diesem Fall nur um geringfügige, nicht signifikante, Änderungen handelt.

Nach 30 Minuten Inkubation konnte ein deutlicher Anstieg in der Genexpression von ATF3 in allen Gruppen beobachtet werden. Auch hier fallen hohe Standardabweichungen auf. Während in allen KO-Splenozyten die Werte tendenziell höher waren, als in den WT-Splenozyten, konnten zwischen den verschiedenen Interventions- und Therapiegruppen keine Unterschiede beobachtet werden. Dies spricht a. e. für einen Einfluss der Zellkultur bzw. der Verarbeitung der Zellen. Da auch nach der Zellkultur ein leichter Unterschied zwischen WT- und KO-Tieren zu beobachten war, spricht auch dies für einen möglichen Einfluss des Knockouts. Somit korrelieren die Ergebnisse, die sich hinsichtlich der gesteigerten Expression in

den Vehikel-Gruppen zeigten, mit den Erkenntnissen, dass ATF3 unter Stressbedingungen [187] und in geschädigten Organen vermehrt exprimiert wird [188]. Bezüglich einer immunmodulatorischen Wirkung von ATF3 ist die Datenlage teilweise kontrovers. So wurde bisher eine protektive Wirkung im Rahmen akuter Inflammation durch Inhibition der Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF $\alpha$  beschrieben [190]. In vielen Szenarien scheinen insgesamt jedoch die vermeintlich proapoptotischen und somit negativen Eigenschaften (oxidativer Stress, Infektionen etc.) zu überwiegen [191].

Die These, dass die ATF3-Expression im Zusammenhang mit der Melatoninwirkung stehen könnte, stützt sich neben Ergebnissen unserer AG (ATF3 im hämorrhagischem Schock) auf weiterführende Daten, die u. a. zellprotektive Wirkungen unter ATF3-Suppression [192] aufzeigen. Diese Beobachtungen konnten im Rahmen unserer Untersuchungen nicht bestätigt werden. Somit ist für ATF3 kein Zusammenhang zwischen splenischer Genexpression und Melatonintherapie darstellbar. Möglicherweise spielen in der Sepsis andere pathophysiologische Mechanismen als im hämorrhagischen Schock eine Rolle, bzw. könnte Melatonin organspezifisch unterschiedliche Wirkungen entfalten.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine insgesamt veränderte Genexpression in murinen, rezeptordefizienten Milzzellen. Dabei führt der Melatonin-Knockout zu einer erhöhten proinflammatorischen Aktivität nach polymikrobieller Sepsis. Ein Einfluss durch die exogene Applikation von Melatonin konnte jedoch nicht beobachtet werden. Über welche molekularen Mechanismen diese Veränderung vermittelt wird, ist nach wie vor unklar.

### 5.2.3 Protein-Analyse

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen der Melatonintherapie auf intrazelluläre Signalwege nach polymikrobieller Sepsis in Splenozyten. Es wurden die MAP-Kinasen ERK, p38, JNK sowie die Proteinkinase Akt genauer analysiert.

#### 5.2.3.1 Aktivierung von PI3/Akt

Während sich in den Sham-Splenozyten der WT- und KO-Tiere jeweils basale Werte der Akt-Aktivität darstellten, zeigten sich in den CLI-Tieren unter Vehikel-Therapie um bis zu 20% erhöhte Intensitäten. Nach Inkubation mit Melatonin zeigte sich in den Wildtypen ein weiterer Anstieg auf insgesamt 150%. Genau Gegenteilig verhielt es sich in den Knockout-Tieren. Hier sank die Aktivität von Akt unter Melatonin auf 50%. Diese Ergebnisse sprechen für einen generellen Aktivitätsanstieg nach CLI und damit für eine Rolle des PI3/Akt-Signalweges in der Inflammation. Wichtig für die Interpretation ist vor allem die Beobachtung, dass Akt nicht allein durch die Operationsprozeduren hochreguliert wird. Damit kann die initiierte Inflammation als Auslöser hierfür definiert werden. Der lediglich leichte Anstieg von 20% könnte durch einen möglicherweise nicht optimal gewählten Beobachtungszeitraum unter CLI bedingt sein. Möglicherweise könnte der Zeitpunkt von 1 h hierfür nicht optimal gewählt sein und ein veränderter Versuchsaufbau zu signifikanteren Ergebnissen führen. Dennoch scheint auch bereits in unserem Falle, nach 1 h, eine Stimulation dieses Signalweges erfolgt zu sein. Entsprechend den Ergebnissen von Schabbauer *et al.* könnte dies zu einer Reduktion der systemischen Inflammation mit verbessertem Überleben führen [25]. Diese Wirkung scheint nach unseren Beobachtungen unabhängig vom Melatonin-Knockout zu sein. Allerdings könnte die gegensätzliche Wirkung von Melatonin in Zusammenhang mit der Rezeptordefizienz stehen. Ein möglicher Interpretationsansatz könnte eine durch Melatonin bewirkte Verstärkung der immunprotektiven Wirkung im Rahmen der Inflammation sein. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in neuronalen Zellen nach induziertem Zelltod beobachtet [193]. Dabei führte die Melatoninapplikation zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung im PI3/Akt-Weg mit verbessertem Überleben. Aufgrund der Beobachtung, dass die Therapie mit Melatonin in Rezeptor-defizienten Zellen zu einem gegensätzlichen Ergebnis mit deutlicher Reduktion um 50% führte, lassen sich folgende Behauptungen aufstellen: zum einen liegt die Vermutung nahe, dass der

Knockout einen Einfluss auf den PI3/Akt-Signalweg hat. Entsprechend würde die Reduktion der Akt-Aktivität mit einer gesteigerten proinflammatorischen Aktivität einhergehen und der Knockout somit als negativer Prädiktor in der Sepsis gelten. Zum anderen scheint der durch Melatonin vermittelte protektive Effekt a. e. rezeptorvermittelt zu sein. Diese Beobachtungen werden weiterhin von Kong *et al.* untermauert, die nach Versuchen mit spezifischen Melatoninrezeptor-Antagonisten gleiche Ergebnisse erzielen konnten [193]. Trotz aktuell unklarer Datenlage bezüglich der Bedeutung des PI3/Akt-Wegs in der Sepsis, scheint in unserem Fall eine positive Rolle zu überwiegen. Zusätzlich scheint Melatonin diesen protektiven Effekt noch zu verstärken.

#### **5.2.3.2 Aktivierung der MAP-Kinasen**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Fehlen der Melatoninrezeptoren MT<sub>1</sub> und MT<sub>2</sub> zu einer gesteigerten Inflammation mit Aktivierung intrazellulärer Signalwege und nachfolgender Produktion proinflammatorischer Zytokine in murinen Milzzellen führt. Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen weist dies auf eine protektive, rezeptorvermittelte Wirkung von Melatonin in der Sepsis hin. Dieser Effekt konnte bereits in unterschiedlichen Zelltypen nach verschiedensten Stimuli, wie z.B. hämorrhagischem Schock, inflammatorischer Zytokine, LPS und UVB-Strahlung demonstriert werden [88, 194]. Ein möglicher Mechanismus für die vermittelte Entzündungsreaktion, basiert auf der Phosphorylierung verschiedener MAPK mit dysregulierter Zytokinproduktion und verändertem Gleichgewicht zwischen Überleben und Zelltod [195]. Allerdings scheint die Wirkung abhängig von Zelltyp und auslösendem Agens zu variieren. Aufgrund des wachsenden Interesses bezüglich ihrer Regulation publizierten Tran *et al.* bereits 2001 Daten, welche die MAPK als Schlüsselenzyme in der Entwicklung der Sepsis identifizierten [196]. Dabei führt die Aktivierung der ERK MAPK zur Aufrechterhaltung der Expression antiapoptotischer Gene mit verbessertem Überleben. Dementsprechend überwiegen bei Hemmung, bzw. übermäßiger Stimulation aufgrund exzessiver ROS-Produktion apoptotische Effekte [28, 197]. Als Gegenspieler von ERK werden die beiden Stresskinasen JNK und p38 MAPK diskutiert, welche über ihre proinflammatorischen Eigenschaften die Wirkung von ERK antagonisieren und damit die Einleitung der Apoptose triggern [26, 198].

Neuere Erkenntnisse aus verschiedensten experimentellen Modellen beschrieben eine Schlüsselrolle der ERK MAPK in der rezeptorvermittelten und –unabhängigen Signaltransduktion von Melatonin [29, 114, 116, 117, 120]. Dabei konnte ein deutlicher, durch Melatonin-vermittelter, Anstieg der ERK-Aktivität beobachtet werden, welcher mit einer abgeschwächten Entzündungsreaktion einherging [199]. Entsprechende Beobachtungen ließen sich auch in dieser Arbeit bestätigen. So führt der MT-Knockout im Vergleich zu den WT-Tieren tendenziell zu einer Inhibition der ERK MAPK mit gleichzeitiger Aktivierung der Stresskinase JNK, während die p38 MAPK unverändert bei basalem Level vorlag. Interessanterweise konnte die Hemmung der ERK unabhängig von der Intervention, mit durchschnittlich um 40% reduzierten Werten von ERK beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu stiegen die Durchschnittswerte von JNK auf das 2,5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe, während die p38 MAPK unbeeinflusst vom Knockout bei basalen Werten blieb. Dennoch sind die Auswirkungen der MT-Rezeptor-Aktivierung auf die Aktivität der MAPK noch nicht abschließend geklärt. Es liegen auch Ergebnisse mit gegenteiligen Daten vor, die eine Reduktion der ERK-Phosphorylierung in neuronalen Zellen beschreiben [121]. Allerdings scheint die ERK-Aktivierung in Nervenzellen, im Gegensatz zu nicht-neuronalen Zellen, in die Entstehung zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen involviert zu sein und somit möglicherweise gegenteilige Wirkungen zu haben [200]. Entsprechend würde die Melatonin-induzierte Hemmung der ERK-Aktivierung in neuronalen Zellen ebenfalls mit einer potentiell protektiven Wirkung einhergehen. Diese kontroverse Datenlage wirft daher die Frage auf, ob die Melatonin-Wirkung bezüglich der ERK MAPK überhaupt isoliert betrachtet werden darf. Viel eher deuten die vielen unterschiedlichen Ergebnisse darauf hin, dass die Melatoninwirkung abhängig von Zelltyp, funktionellem Status der Zelle, Stoffkonzentration und Expression verschiedener Rezeptorsubtypen zu einer individuellen Aktivierung der MAPK führt [116]. Währenddessen gestaltet sich die Datenlage bezüglich der Stresskinasen JNK und p38 als überwiegend einheitlich. So führte die Melatonintherapie in stimulierten [29, 123, 194] als auch unstimulierten [116] Zellen zu einer ERK-vermittelten Hemmung der JNK-Aktivität mit einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine [201]. In Bezug auf die proapoptotische MAPK p38 liegen teilweise unterschiedliche Daten vor. Während hohe Melatonindosen zu einer deutlichen Reduktion der p38-Aktivität führten [202],

konnte die Applikation nanomolarer Mengen keine Veränderung in der Phosphorylierung bewirken [116]. In unseren Versuchen blieben die Aktivitäten von ERK und JNK durch Melatonin unbeeinflusst, während die p38 MAPK in den Wildtyp-Splenozyten durch Melatonin deutlich in ihrer Aktivität gesenkt werden konnte. Die fehlende Wirkung in ERK und JNK könnte möglicherweise durch eine zu niedrig gewählte Melatoninkonzentration bzw. zu kurze oder zu lange Inkubationszeit erklärt werden. Allerdings deuten die Ergebnisse in den MT-KO Tieren auf einen deutlichen Einfluss der Rezeptordefizienz in Splenozyten hin, was somit wiederum in Einklang mit oben beschriebenen Beobachtungen steht. Diese Ergebnisse sprechen daher für eine rezeptorvermittelte Wirkung von Melatonin und damit für eine primär untergeordnete Rolle antioxidativer Effekte in der frühen Phase der Inflammation. Dementsprechend könnte die antioxidative Wirkung erst durch ERK-vermittelte transkriptionelle Regulation verschiedenster Gene vermittelt sein. Möglicherweise könnten dabei die, bereits oben, diskutierten Zytokine und Adhäsionsmoleküle involviert sein. Gemeinsam mit den antioxidativen Eigenschaften scheint Melatonin somit die bereits beschriebenen immunmodulierenden und zellprotektiven Effekte in Bezug auf aktivierte Milzzellen zu unterstützen.

### **5.2.3.3 Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine erhöhte proinflammatorische Aktivität in Melatoninrezeptor-defizienten Milzzellen nach polymikrobieller Sepsis bei der Maus hin. Diese könnte mit einer veränderten Aktivität der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 und der Proteinkinase Akt in Zusammenhang stehen. Dabei lassen die Ergebnisse eine unterschiedliche Regulation dieser MAPK durch Melatonin vermuten.

Die gewonnenen Erkenntnisse sowie die in der Literatur beschriebene zentrale Funktion der MAPK in der Kontrolle pro- und anti-inflammatorischer Gene bestärken die Vermutung der Schlüsselrolle von Melatonin in der Stressantwort von Immunzellen. Weitere umfassendere Studien zu anderen Zeitpunkten in der Sepsisentwicklung sind jedoch nötig, um die molekularen Mechanismen der melatonininduzierten Immunprotektion zu untersuchen. Die vorliegenden Daten könnten dabei als Grundlage für weitere Forschungen herangezogen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Angus, D.C., et al., Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001. 29(7): p. 1303-10.
2. Engel, C., et al., Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 2007. 33(4): p. 606-18.
3. Bone, R.C., C.L. Sprung, and W.J. Sibbald, Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med*, 1992. 20(6): p. 724-6.
4. Schottmüller, H., *Wesen und Behandlung der Sepsis*. *Verh Dtsch Ges Inn Med*, 1914(31): p. 257-280
5. Schuster, H., *Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen*. in Schuster HP (ed.) *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen*, Berlin Heidelberg New-York, Springer-Verlag, 1996: p. 3-22.
6. Bone, R.C., et al., *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. *Chest*, 1992. 101(6): p. 1644-55.
7. Reinhart, K., et al., *Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI))*. *Ger Med Sci*, 2010. 8: p. Doc14.
8. Brun-Buisson, C., F. Doyon, and J. Carlet, *Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 154(3 Pt 1): p. 617-24.
9. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. *Nature*, 2002. 420(6917): p. 885-91.
10. ten Cate, H., et al., *Microvascular coagulopathy and disseminated intravascular coagulation*. *Crit Care Med*, 2001. 29(7 Suppl): p. S95-7; discussion S97-8.
11. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis*. *N Engl J Med*, 2003. 348(2): p. 138-50.
12. Eckert, P., Eichfuss, H.P., *Transperitoneale Resorption des Peritoneums bei der akuten und chronischen Peritonitis*. *Langenbecks Arch. Chir.*, 1978(346): p. 187-192.
13. Deitch, E.A., *Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings?* *Surgery*, 2002. 131(3): p. 241-4.
14. Deitch, E.A., *Gut-origin sepsis: Evolution of a concept*. *Surgeon*, 2012.
15. Steiniger, B. and P. Barth, *Microanatomy and function of the spleen*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2000. 151: p. III-IX, 1-101.
16. Johnston, B. and E.C. Butcher, *Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration*. *Semin Immunol*, 2002. 14(2): p. 83-92.



17. Gordon, S., *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response*. Cell, 2002. 111(7): p. 927-30.
18. Swirski, F.K., et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science, 2009. 325(5940): p. 612-6.
19. Trudewind, M., *Autonomes Nervensystem und Immunabwehr: Bedeutung der noradrenergen Innervation für die Migration von Splenozyten in die Milz*. 2004.
20. Cuschieri, J. and R.V. Maier, *Mitogen-activated protein kinase (MAPK)*. Crit Care Med, 2005. 33(12 Suppl): p. S417-9.
21. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Acts*. Genes Dev, 1999. 13(22): p. 2905-27.
22. Guha, M. and N. Mackman, *The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells*. J Biol Chem, 2002. 277(35): p. 32124-32.
23. Deane, J.A. and D.A. Fruman, *Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 563-98.
24. Li, T., et al., *Oligomeric BAX induces mitochondrial permeability transition and complete cytochrome c release without oxidative stress*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1777(11): p. 1409-21.
25. Schabbauer, G., et al., *PI3K-Akt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(10): p. 1963-9.
26. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. 298(5600): p. 1911-2.
27. Boulton, T.G. and M.H. Cobb, *Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies*. Cell Regul, 1991. 2(5): p. 357-71.
28. Monick, M.M., et al., *Constitutive ERK MAPK activity regulates macrophage ATP production and mitochondrial integrity*. J Immunol, 2008. 180(11): p. 7485-96.
29. Luchetti, F., et al., *ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells*. Free Radic Biol Med, 2009. 46(3): p. 339-51.
30. Cobb, M.H., et al., *The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2*. Semin Cancer Biol, 1994. 5(4): p. 261-8.
31. Hidari, K.I.P.J., et al., *Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(45): p. 28750-28756.
32. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update*. Physiol Rev, 2012. 92(2): p. 689-737.

33. Kaplan, J.M., et al., *Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)-1/2 Is Associated with the Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)-gamma during Polymicrobial Sepsis*. Molecular Medicine, 2010. 16(11-12): p. 491-497.
34. Zingarelli, B., et al., *Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways*. J Immunol, 2003. 171(12): p. 6827-37.
35. Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., *Proinflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine*. J Biol Chem, 1995(270): p. 7420-7426.
36. Chen, Z., et al., *MAP kinases*. Chem Rev, 2001. 101(8): p. 2449-76.
37. Herlaar, E. and Z. Brown, *p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease*. Mol Med Today, 1999. 5(10): p. 439-47.
38. Pietersma, A., et al., *P38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 230(1): p. 44-48.
39. Keshari, R.S., et al., *Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA- induced NETs release from human neutrophils*. J Cell Biochem, 2012.
40. Ono, K. and J. Han, *The p38 signal transduction pathway: activation and function*. Cell Signal, 2000. 12(1): p. 1-13.
41. Ma, W., et al., *The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(17): p. 13664-13674.
42. Larsen, J.K., et al., *Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 1997. 273(5): p. L930-L940.
43. Ip, Y.T. and R.J. Davis, *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development*. Curr Opin Cell Biol, 1998. 10(2): p. 205-219.
44. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 in cell proliferation and survival*. Oncogene, 2001. 20(19): p. 2390-400.
45. Constant, S.L., et al., *JNK1 is required for T cell-mediated immunity against Leishmania major infection*. J Immunol, 2000. 165(5): p. 2671-6.
46. Ishizuka, T., et al., *Mast cell tumor necrosis factor alpha production is regulated by MEK kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(12): p. 6358-63.
47. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. 9(2): p. 240-6.
48. Lin, A., *Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis*. Bioessays, 2003. 25(1): p. 17-24.

49. Zha, J., et al., Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 1996. 87(4): p. 619-28.
50. Ato, M., et al., Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol*, 2002. 3(12): p. 1185-91.
51. McCord, C.P., Allen F.P., Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *Journal of experimental zoology*, 1917.
52. Lerner, A.B.C., J.D.; Takahashi, Y., Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985. 80(10).
53. Hardeland R, F.B., Ubiquitous melatonin – presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.*, 1996. 2: p. 25-45.
54. Cardinali, D.P. and P. Pevet, Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*, 1998. 2(3): p. 175-90.
55. Macchi, M.M. and J.N. Bruce, Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 2004. 25(3-4): p. 177-95.
56. Bubenik, G.A., Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci*, 2002. 47(10): p. 2336-48.
57. Tosini, G. and M. Menaker, The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res*, 1998. 789(2): p. 221-8.
58. Tijmes, M., R. Pedraza, and L. Valladares, Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*, 1996. 61(2): p. 65-8.
59. Slominski, A., et al., On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine*, 2005. 27(2): p. 137-48.
60. Iwasaki, S., et al., Melatonin as a local regulator of human placental function. *J Pineal Res*, 2005. 39(3): p. 261-5.
61. Conti, A., et al., Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res*, 2000. 28(4): p. 193-202.
62. Carrillo-Vico, A., et al., Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J*, 2004. 18(3): p. 537-9.
63. Guerrero, J.M. and R.J. Reiter, Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem*, 2002. 2(2): p. 167-79.
64. Carrillo-Vico, A., et al., Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(4): p. 8638-83.
65. Carrillo-Vico, A., et al., A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 2005. 27(2): p. 189-200.
66. Nelson, R.J. and D.L. Drazen, Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 917: p. 404-15.

67. Maestroni, G.J., A. Conti, and W. Pierpaoli, Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol*, 1986. 13(1): p. 19-30.
68. Petrovsky, N. and L.C. Harrison, Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance? *J Immunol*, 1997. 158(11): p. 5163-8.
69. Fernandes, G., et al., Circadian rhythm in activity of lympholytic natural killer cells from spleens of Fischer rats. *J Immunol*, 1979. 123(2): p. 622-5.
70. Vaughan, M.K., et al., Splenic hypertrophy and extramedullary hematopoiesis induced in male Syrian hamsters by short photoperiod or melatonin injections and reversed by melatonin pellets or pinealectomy. *Am J Anat*, 1987. 179(2): p. 131-6.
71. Vaughan, M.K., et al., Influence of melatonin, constant light, or blinding on reproductive system of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Experientia*, 1976. 32(10): p. 1341-2.
72. Liu, F., T.B. Ng, and M.C. Fung, Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines. *J Neural Transm*, 2001. 108(4): p. 397-405.
73. Garcia-Maurino, S., et al., Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol*, 1997. 159(2): p. 574-81.
74. Carrillo-Vico, A., et al., Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *FASEB J*, 2003. 17(6): p. 755-7.
75. Benitez-King, G., et al., Melatonin activates PKC-alpha but not PKC-epsilon in N1E-115 cells. *Neurochem Int*, 2001. 39(2): p. 95-102.
76. Winczyk, K., et al., Possible involvement of the nuclear RZR/ROR-alpha receptor in the antitumor action of melatonin on murine Colon 38 cancer. *Tumour Biol*, 2002. 23(5): p. 298-302.
77. Reppert, S.M., D.R. Weaver, and T. Ebisawa, Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 1994. 13(5): p. 1177-85.
78. Reppert, S.M., et al., Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(19): p. 8734-8.
79. Nosjean, O., et al., Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*, 2000. 275(40): p. 31311-7.
80. Benitez-King, G. and F. Anton-Tay, Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, 1993. 49(8): p. 635-41.
81. Carlberg, C. and I. Wiesenberger, The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res*, 1995. 18(4): p. 171-8.

82. Becker-Andre, M., et al., Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem*, 1994. 269(46): p. 28531-4.
83. Yu, Z.H., et al., [125I]iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals. *Neurosci Lett*, 1991. 125(2): p. 175-8.
84. Garcia-Perganeda, A., et al., Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Immunol*, 1997. 159(8): p. 3774-81.
85. Garcia-Perganeda, A., et al., Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Neuroimmunol*, 1999. 95(1-2): p. 85-94.
86. Carrillo-Vico, A., et al., Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci*, 2003. 60(10): p. 2272-8.
87. Garcia-Maurino, S., et al., Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci*, 1999. 65(20): p. 2143-50.
88. Carrillo-Vico, A., et al., Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res*, 2005. 39(4): p. 400-8.
89. Maestroni, G.J., Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. *J Pineal Res*, 1996. 20(2): p. 84-9.
90. Wu, J.Y., et al., Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res*, 2008. 45(1): p. 106-16.
91. Wu, C.C., et al., Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J Pineal Res*, 2001. 30(3): p. 147-56.
92. Reiter, R.J., et al., Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 917: p. 376-86.
93. Raghavendra, V., et al., Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists. *Mol Cell Biochem*, 2001. 221(1-2): p. 57-62.
94. Cuzzocrea, S. and R.J. Reiter, Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem*, 2002. 2(2): p. 153-65.
95. El-Sokkary, G.H., et al., Role of melatonin in reduction of lipid peroxidation and peroxynitrite formation in non-septic shock induced by zymosan. *Shock*, 1999. 12(5): p. 402-8.
96. Pieri, C., et al., Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci*, 1994. 55(15): p. PL271-6.
97. Cagnoli, C.M., et al., Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res*, 1995. 18(4): p. 222-6.

98. Reiter, R.J., et al., Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2009. 44(4): p. 175-200.
99. Tamura, E.K., et al., Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res*, 2009. 46(3): p. 268-74.
100. Rodriguez, C., et al., Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 2004. 36(1): p. 1-9.
101. Winiarska, K., et al., Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits. *J Pineal Res*, 2006. 40(2): p. 168-76.
102. Ressmeyer, A.R., et al., Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep*, 2003. 8(4): p. 205-13.
103. Veneroso, C., et al., Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res*, 2009. 47(2): p. 184-91.
104. Maestroni, G.J., et al., Melatonin in rheumatoid arthritis: synovial macrophages show melatonin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 966: p. 271-5.
105. Lardone, P.J., et al., A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(3): p. 516-25.
106. Carrillo-Vico, A., et al., The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006. 7(5): p. 423-31.
107. Drazen, D.L. and R.J. Nelson, Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology*, 2001. 74(3): p. 178-84.
108. Iiyama, K., et al., Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*, 1999. 85(2): p. 199-207.
109. Motilva, V., et al., New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *J Pineal Res*, 2011. 51(1): p. 44-60.
110. Bertuglia, S., P.L. Marchiafava, and A. Colantuoni, Melatonin prevents ischemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Cardiovasc Res*, 1996. 31(6): p. 947-52.
111. Radogna, F., et al., Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. *J Pineal Res*, 2008. 44(3): p. 316-25.
112. Radogna, F., et al., Melatonin antagonizes apoptosis via receptor interaction in U937 monocytic cells. *J Pineal Res*, 2007. 43(2): p. 154-62.
113. Jockers, R., et al., Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol*, 2008. 154(6): p. 1182-95.

114. Hayashi, Y., et al., p38 mitogen-activated protein kinase regulates oscillation of chick pineal circadian clock. *J Biol Chem*, 2003. 278(27): p. 25166-71.
115. New, D.C., S.T. Tsim, and Y.H. Wong, G protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction. *Neurosignals*, 2003. 12(2): p. 59-70.
116. Chan, A.S., et al., Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal*, 2002. 14(3): p. 249-57.
117. Bondi, C.D., et al., MT1 melatonin receptor internalization underlies melatonin-induced morphologic changes in Chinese hamster ovary cells and these processes are dependent on Gi proteins, MEK 1/2 and microtubule modulation. *J Pineal Res*, 2008. 44(3): p. 288-98.
118. Junttila, M.R., S.P. Li, and J. Westermarck, Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*, 2008. 22(4): p. 954-65.
119. Castro, L.M., M. Gallant, and L.P. Niles, Novel targets for valproic acid: up-regulation of melatonin receptors and neurotrophic factors in C6 glioma cells. *J Neurochem*, 2005. 95(5): p. 1227-36.
120. Cui, P., et al., Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. *J Pineal Res*, 2008. 44(1): p. 107-14.
121. Imbesi, M., et al., Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT1 and MT2 melatonin receptors. *Brain Res*, 2008. 1227: p. 19-25.
122. Min, K.J., J.H. Jang, and T.K. Kwon, Inhibitory effects of melatonin on the lipopolysaccharide-induced CC chemokine expression in BV2 murine microglial cells are mediated by suppression of Akt-induced NF-kappaB and STAT/GAS activity. *J Pineal Res*, 2012. 52(3): p. 296-304.
123. Tunon, M.J., et al., Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res*, 2011. 50(1): p. 38-45.
124. Carbajo-Pescador, S., et al., Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor. *J Pineal Res*, 2011. 51(4): p. 463-71.
125. Witt-Enderby, P.A., et al., Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2000. 46(1): p. 28-42.
126. Bordt, S.L., et al., N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neurites in response to melatonin. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1499(3): p. 257-64.
127. Zhu, H.Q., et al., Melatonin prevents oxidized low-density lipoprotein-induced increase of myosin light chain kinase activation and expression in HUVEC through ERK/MAPK signal transduction. *J Pineal Res*, 2008. 45(3): p. 328-34.

128. Kilic, U., et al., Evidence that membrane-bound G protein-coupled melatonin receptors MT1 and MT2 are not involved in the neuroprotective effects of melatonin in focal cerebral ischemia. *J Pineal Res*, 2012. 52(2): p. 228-35.
129. Angele, M.K., et al., Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. *Shock*, 2000. 14(2): p. 81-90.
130. Pietropaoli, A.P., et al., Gender differences in mortality in patients with severe sepsis or septic shock. *Gend Med*, 2010. 7(5): p. 422-37.
131. Wichmann, M.W., et al., Enhanced immune responses in females, as opposed to decreased responses in males following haemorrhagic shock and resuscitation. *Cytokine*, 1996. 8(11): p. 853-63.
132. Caligioni, C.S., Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*, 2009. Appendix 4: p. Appendix 4I.
133. Allen, E., The oestrus cycle in the mouse. *Am J Anat*, 2005, 1920. 30(3).
134. Vianney, M.J., Vaginal Cytodiagnosis of the Estrous Cycle of the Mouse with Fluorescence Microscopy. *Fertil Steril*, 1965. 16: p. 401-14.
135. Walmer, D.K., et al., Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 1992. 131(3): p. 1458-66.
136. Morrow, D.A., Current therapy in Theriogenology. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1986: p. 158-161.
137. Yuan Y, C.R.G., Structure, cyclic changes, and function, vagina and vulva, rat. *Genital System*. Jones, T. C., U. Mohr and R. D. Hunt (Hsg.) Heidelberg: Springer-Verlag, 1987: p. 161-168.
138. Coligan J E, K.A.M., Margulies D H, Shevach E M, Strober W, In vitro assays for mouse lymphocyte function. In: *Current Protocols in Immunology* John Wiley & Sons, Inc., New York, 1992: p. S. 3.1.3-3.1.5.
139. Chomczynski, P. and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. 162(1): p. 156-9.
140. Mullis, K., et al., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986. 51 Pt 1: p. 263-73.
141. Higuchi, R., et al., Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 1993. 11(9): p. 1026-30.
142. Guescini, M., et al., A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. *BMC Bioinformatics*, 2008. 9: p. 326.
143. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.



144. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
145. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
146. Sambrook, J.R., D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
147. Engvall, E. and P. Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971. 8(9): p. 871-4.
148. Christaki, E., et al., Estrogen receptor beta agonism increases survival in experimentally induced sepsis and ameliorates the genomic sepsis signature: a pharmacogenomic study. *J Infect Dis*, 2010. 201(8): p. 1250-7.
149. Buras, J.A., B. Holzmann, and M. Sitkovsky, Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(10): p. 854-65.
150. Wichterman K.A., B.A.E., Chaudry I.H., Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*, 1980. 29: p. 189-201.
151. Lustig, M.K., et al., Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock*, 2007. 28(1): p. 59-64.
152. Scheiermann, P., et al., Cecal ligation and incision: an acute onset model of severe sepsis in rats. *J Surg Res*, 2009. 151(1): p. 132-7.
153. Bauer, P., et al., Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000. 278(5): p. R1140-7.
154. Poli-de-Figueiredo, L.F., et al., Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*, 2008. 30 Suppl 1: p. 53-9.
155. Drazen, D.L., et al., Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. 280(5): p. R1476-82.
156. Kennaway, D.J., et al., Melatonin in mice: rhythms, response to light, adrenergic stimulation, and metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002. 282(2): p. R358-65.
157. Rousseau, A., et al., Serum and cerebrospinal fluid concentrations of melatonin: a pilot study in healthy male volunteers. *J Neural Transm*, 1999. 106(9-10): p. 883-8.
158. Heid, C.A., et al., Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996. 6(10): p. 986-94.
159. Bustin, S.A., et al., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 2009. 55(4): p. 611-22.
160. Egger, D. and K. Bienz, Protein (western) blotting. *Mol Biotechnol*, 1994. 1(3): p. 289-305.

161. Westermeier, R., *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*, Fourth Edition. 2. Edition, VHC, Weinheim, 1997: p. S.175ff.
162. Chang, M.M. and J. Lovett, A laboratory exercise illustrating the sensitivity and specificity of Western blot analysis. *Biochem Mol Biol Educ*, 2011. 39(4): p. 291-7.
163. Bates, D.W., et al., Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *J Infect Dis*, 1997. 176(6): p. 1538-51.
164. Dhabhar, F.S., et al., Stress-induced redistribution of immune cells--from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones--Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology*, 2012. 37(9): p. 1345-68.
165. Toft, P., et al., Redistribution of lymphocytes after major surgical stress. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1993. 37(3): p. 245-9.
166. Buttenschoen, K., K. Fathimani, and D.C. Buttenschoen, Effect of major abdominal surgery on the host immune response to infection. *Curr Opin Infect Dis*, 2010. 23(3): p. 259-67.
167. Desborough, J.P., The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth*, 2000. 85(1): p. 109-17.
168. Baker, E.A., et al., Profiles of inflammatory cytokines following colorectal surgery: relationship with wound healing and outcome. *Wound Repair Regen*, 2006. 14(5): p. 566-72.
169. Redl, H., et al., Markers of endotoxin related leukocyte activation and injury mechanisms. *Prog Clin Biol Res*, 1991. 367: p. 83-100.
170. Cavaillon, J.M., et al., Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis*, 2003. 35(9): p. 535-44.
171. Salas, A., et al., Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. *Gut*, 2000. 47(1): p. 88-96.
172. Takala, A., et al., Markers of systemic inflammation predicting organ failure in community-acquired septic shock. *Clin Sci (Lond)*, 1999. 97(5): p. 529-38.
173. Reinhart, K., et al., Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med*, 2002. 30(5 Suppl): p. S302-12.
174. Rodriguez-Reynoso, S., et al., Effect of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia/reperfusion: possible role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Surg Res*, 2001. 100(2): p. 141-9.
175. Zhang, J.Y., et al., *[Effects of melatonin on anti-oxidative function of lung injury induced by lipopolysaccharide in rats and ICAM-1 expression]*. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2008. 24(4): p. 464-7.
176. Gallatin, W.M., I.L. Weissman, and E.C. Butcher, *A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes*. *Nature*, 1983. 304(5921): p. 30-4.

177. Lotufo, C.M., et al., *Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation*. Eur J Pharmacol, 2001. 430(2-3): p. 351-7.
178. Rose, J.J., et al., *On the mechanism and significance of ligand-induced internalization of human neutrophil chemokine receptors CXCR1 and CXCR2*. J Biol Chem, 2004. 279(23): p. 24372-86.
179. Raghuwanshi, S.K., et al., *The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 couple to distinct G protein-coupled receptor kinases to mediate and regulate leukocyte functions*. J Immunol, 2012. 189(6): p. 2824-32.
180. Wagner, J.G. and R.A. Roth, *Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature*. Pharmacol Rev, 2000. 52(3): p. 349-74.
181. Brenner, B., et al., *L-selectin activates JNK via src-like tyrosine kinases and the small G-protein Rac*. Immunology, 1997. 92(2): p. 214-9.
182. Waddell, T.K., et al., *Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase*. J Biol Chem, 1995. 270(25): p. 15403-11.
183. Schleiffenbaum, B., O. Spertini, and T.F. Tedder, *Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity*. J Cell Biol, 1992. 119(1): p. 229-38.
184. Recchioni, R., et al., *Melatonin increases the intensity of respiratory burst and prevents L-selectin shedding in human neutrophils in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 252(1): p. 20-4.
185. Arias, J., et al., *[Effect of melatonin on lymphocyte proliferation and production of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in mice splenocytes]*. Invest Clin, 2003. 44(1): p. 41-50.
186. Hoyer, K.K., et al., *Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease*. Immunol Rev, 2008. 226: p. 19-28.
187. Lu, D., J. Chen, and T. Hai, *The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases*. Biochem J, 2007. 401(2): p. 559-67.
188. Chen, B.P., C.D. Wolfgang, and T. Hai, *Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10*. Mol Cell Biol, 1996. 16(3): p. 1157-68.
189. Harper, E.G., S.M. Alvares, and W.G. Carter, *Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes*. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 15): p. 3471-85.
190. Gilchrist, M., et al., *Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4*. Nature, 2006. 441(7090): p. 173-8.
191. Gilchrist, M., et al., *Activating transcription factor 3 is a negative regulator of allergic pulmonary inflammation*. J Exp Med, 2008. 205(10): p. 2349-57.

192. Zmuda, E.J., et al., *Deficiency of Atf3, an adaptive-response gene, protects islets and ameliorates inflammation in a syngeneic mouse transplantation model*. Diabetologia, 2010. 53(7): p. 1438-50.
193. Kong, P.J., et al., *Melatonin Induces Akt Phosphorylation through Melatonin Receptor- and PI3K-Dependent Pathways in Primary Astrocytes*. Korean J Physiol Pharmacol, 2008. 12(2): p. 37-41.
194. Shi, D., et al., *Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated CRL1999 cells via targeting MAPK, NF-kappaB, c/EBPbeta, and p300 signaling*. J Pineal Res, 2012. 53(2): p. 154-65.
195. Hommes, D.W., M.P. Peppelenbosch, and S.J. van Deventer, *Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets*. Gut, 2003. 52(1): p. 144-51.
196. Tran, S.E., et al., *MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors*. J Biol Chem, 2001. 276(19): p. 16484-90.
197. Lu, Z. and S. Xu, *ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis*. IUBMB Life, 2006. 58(11): p. 621-31.
198. Xia, Z., et al., *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*. Science, 1995. 270(5240): p. 1326-31.
199. Witt-Enderby, P.A., et al., *Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy*. J Pineal Res, 2006. 41(4): p. 297-305.
200. Cheung, E.C. and R.S. Slack, *Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis*. Sci STKE, 2004. 2004(251): p. PE45.
201. Kim, G.D., et al., *Melatonin suppresses acrolein-induced IL-8 production in human pulmonary fibroblasts*. J Pineal Res, 2012. 52(3): p. 356-64.
202. Genade, S., et al., *Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of its anti-adrenergic actions*. J Pineal Res, 2008. 45(4): p. 449-58.

## **7                    Publikationen / Dank**

### **7.1                Publikationen**

Kleber A, Altmeyer S, Wolf B, Wolf A, Volk T, Fink T, Kubulus D. Impact of melatonin receptor deletion on intracellular signaling in spleen cells of mice after polymicrobial sepsis. *J Pineal Res.*, *submitted*

Kleber A, Altmeyer S, Fink T, Wolf B, Wolf A, Volk T, Kubulus D. Einfluss von Melatoninrezeptoren auf die Expression proinflammatorischer Mediatoren in Milzzellen nach polymikrobieller Sepsis bei der Maus. *Anästh Intensivmed* 2013; 54: S.231 (Posterpräsentation)

## 7.2 Dank

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Darius Kubulus, für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen, sowie die stets unermüdliche und kompetente Betreuung bei allen Fragen und Problemen bedanken.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Volk, dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie am Universitätsklinikum des Saarlandes, für die Möglichkeit der Mitarbeit in der Arbeitsgruppe und die fortwährende Unterstützung der Forschungsarbeiten.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Astrid Kleber, ohne dessen unermüdliches Korrekturlesen und gute Ideen und Ratschläge ich sicherlich nicht das geleistet hätte, was ich nun geschafft habe. Vielen Dank für die investierte Zeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die großartige Unterstützung. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Alexander Wolf und Herrn Dr. Tobias Fink, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und bei so manchen Problemen hilfsbereite und tatkräftige Ansprechpartner waren.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Beate Wolf, die mich in die praktische Durchführung der molekularbiologischen Experimente einwies und durch ihre große Erfahrung, umsichtige Art und Geduld wesentlich zum Gelingen der Experimente beitrug.

Auch möchte ich mich in diesem Rahmen bei meinen Freunden bedanken, die mich stets unterstützt und motiviert haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir jederzeit und in jeder Hinsicht zur Seite stand und mich nicht zuletzt ständig motiviert und unterstützt hat diese Dissertation fertig zu stellen. Durch ihren ständigen uneingeschränkten Rückhalt wurde mir die Durchführung des Medizinstudiums erst ermöglicht.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Sarah Altmeyer
Geburtsdatum	27.12.1982
Geburtsort	Illingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Hans-Peter Altmeyer (Schreinermeister) Rita Altmeyer (Krankenschwester)
Geschwister	Sebastian (Student der Sportwissenschaften)

### Ausbildung

#### Schulausbildung

1989 – 1993	Grundschule Bischmisheim, Saarbrücken
1993 – 2002	Deutsch-Französisches-Gymnasium, Saarbrücken
Juni 2002	Abitur (Gesamtnote 2,4)

#### Berufsausbildung

2002 – 2003	Freiwilliges Soziales Jahr, Ausbildung zur Rettungssanitäterin, ASB Saarbrücken
2003 – 2004	Ausbildung zur Rettungsassistentin, Düsseldorf
2005 – 2008	Anstellung als hauptamtliche Rettungsassistentin, ASB Saarbrücken und Neunkirchen

#### Hochschulausbildung

Oktober 2008 - September 2009	Studium der Rechtswissenschaften, Universität des Saarlandes
Oktober 2008	Immatrikulation an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar (Humanmedizin)

August 2010	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Februar 2012 -	Promotion in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Volk)
seit August 2013	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum des Saarlandes, Wahlfach Dermatologie

**Famulaturen**

August 2011	Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes
September 2011	Akutgeriatrie der SHG Kliniken Saarbrücken-Brebach
Februar - April 2013	Internistische Notaufnahme, Universitätsklinikum des Saarlandes